

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA  
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E  
SINTÉTICOS BIOATIVOS

**Alethéia Lacerda da Silveira**

**TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DOS ANÁLOGOS  
DAS RIPARINAS I, II E III UTILIZANDO  
MODELOS *IN VITRO***

João Pessoa – PB

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ALETHÉIA LACERDA DA SILVEIRA**

**TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DOS ANÁLOGOS DAS  
RIPARINAS I, II E III UTILIZANDO MODELOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo**

João Pessoa – PB

2007

S 587t Silveira, Alethéia Lacerda da.

Toxicidade pré-clínica dos análogos das riparinas I, II e III utilizando modelos *in vitro* / Alethéia Lacerda da Silveira – João Pessoa, 2007.

83p.:il. –

Orientador: Demetrius Antônio Machado de Araújo.  
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS.

1. Produtos Naturais 2. Citotoxicidade 3. Riparinas  
4. Citometria de fluxo.

UFPB/BC

CDU:615(01/3)

**ALETHÉIA LACERDA DA SILVEIRA**

**TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DOS ANÁLOGOS DAS RIPARINAS I, II E III  
UTILIZANDO MODELOS *IN VITRO***

Aprovada em 26 de fevereiro de 2007

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo  
Universidade Federal da Paraíba  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Veras Costa-Lotufo  
Universidade Federal do Ceará  
Examinadora externa

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz  
Universidade Federal da Paraíba  
Examinadora interna

# Agradecimentos

A Deus que, por conta de seu infinito amor e constante misericórdia, concedeu-me tudo o que preciso.

A minha mãe, Socorro Lacerda, ao meu “pai”, Antônio Roberto, e ao meu irmão, Adonai Lacerda, por todo amor, apoio, preocupação e bons exemplos.

A minha família, que sempre torce por mim.

A Josimar Alves de Lima, cujo amor, compreensão e companheirismo foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos verdadeiros amigos, que dão um gosto especial à vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado Araújo, pela confiança em mim depositada, contribuindo para meu crescimento pessoal e acadêmico.

As professoras Letícia Veras Costa-Lotufo e Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, por gentilmente terem aceitado participar da minha banca de defesa e contribuírem com seus conhecimentos.

A Prof.<sup>a</sup> Claudia do Ó Pessoa, pela acolhida e oportunidade concedida para a execução dos experimentos de citometria de fluxo no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE/UFC) e a Prof.<sup>a</sup> Márcia Regina Piuvezam, pelo apoio à realização dos experimentos de citotoxicidade basal.

Aos professores e alunos do LOE/UFC, que me acolheram muitíssimo bem.

A Gardênia Carmem Gadelha Militão, por todo apoio e ajuda nos experimentos realizados no LOE.

Aos colegas da minha turma de Mestrado, em especial a Nayara Macedo Magalhães e Fabrícia Costa Montenegro.

Aos colegas do LEBIM, LABIME e grupo BIOMOL (DBM/UFPB), companheiros da luta diária.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF/UFPB).

A CAPES e a UFPB pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!!!!!!!!!!!!!!!

Sinto-me bastante orgulhosa em apresentar a primeira Dissertação, no LTF/UFPB, envolvendo os temas de citotoxicidade e morte celular.

A todos, com muito carinho!

**Alethéia Lacerda da Silveira**

"A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos".

Platão



## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>I</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>III</b>
<b>Lista de símbolos e abreviaturas .....</b>	<b>IV</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Produtos Naturais .....	2
1.2 Citotoxicidade .....	3
1.3 Aspectos botânicos, químicos e etnofarmacológicos de <i>Aniba riparia</i> (Ness) Mez .....	9
1.3.1 Aspectos farmacológicos dos análogos sintéticos das riparinas I, II e III .....	11
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Geral .....	14
2.2 Específicos .....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Materiais .....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Equipamentos .....	16
3.1.2 Substâncias testes .....	17
3.1.2.1 Obtenção das compostos sintéticos .....	17
3.1.2.2 Preparo das soluções estoques .....	18
3.1.3 Soluções e reagentes .....	19
3.1.4 Modelo biológico experimental .....	22

<b>3.2 Metodologia Experimental</b> .....	23
<b>3.2.1 Estudo da citotoxicidade basal</b> .....	23
3.2.1.1 Redução do sal de tetrazólio (MTT) .....	23
3.2.1.2 Captação do vermelho neutro (CVN) .....	24
3.2.1.3 Conteúdo de ácidos nucleicos totais (CAN) .....	25
3.2.1.4 Análise dos dados .....	26
<b>3.2.2 Estudo do modo de ação</b> .....	27
3.2.2.1 Análise morfológica: Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina .....	28
3.2.2.1.1 Análise dos dados .....	28
3.2.2.2 Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo - Viabilidade celular .....	29
3.2.2.2.1 Análise dos dados .....	29
3.2.2.3 Análise do ciclo celular e da fragmentação do DNA por citometria de fluxo .....	30
3.2.2.3.1 Análise dos dados .....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	31
4.1 Ensaios de citotoxicidade basal .....	32
4.2 Análise morfológica: Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina .....	43
4.3 Determinação da integridade da membrana celular - viabilidade celular .....	44
4.4 Análise do ciclo celular e da fragmentação do DNA por citometria de fluxo .....	46
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fibroblastos L929. Aumento de 400 vezes .....	5
<b>Figura 2:</b> Macrófagos J774. Aumento de 400 vezes .....	5
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do MTT .....	6
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do vermelho neutro .....	7
<b>Figura 5:</b> Principais diferenças morfológicas entre as mortes celulares apoptótica e necrótica .....	8
<b>Figura 6:</b> Estrutura química da riparina I .....	10
<b>Figura 7:</b> Estrutura química da riparina II .....	10
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da riparina III .....	10
<b>Figura 9:</b> Reação de síntese da riparina I .....	17
<b>Figura 10:</b> Reação de síntese da riparina II .....	17
<b>Figura 11:</b> Reação de síntese da riparina III .....	18
<b>Figura 12:</b> Citômetro de fluxo utilizado nos ensaios de determinação da integridade da membrana celular, avaliação do ciclo celular e fragmentação do DNA .....	27
<b>Figura 13:</b> Citotoxicidade da riparina I sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação .....	33
<b>Figura 14:</b> Citotoxicidade da riparina I sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação .....	34

<b>Figura 15:</b> Citotoxicidade da riparina II sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação .....	36
<b>Figura 16:</b> Citotoxicidade da riparina II sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação .....	37
<b>Figura 17:</b> Citotoxicidade da riparina III sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação .....	39
<b>Figura 18:</b> Citotoxicidade da riparina III sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação .....	40
<b>Figura 19:</b> Fotomicrografia das células L929 coradas com Hematoxilina/Eosina em microscópio ótico (400x) .....	43
<b>Figura 20:</b> Histogramas da determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo .....	44
<b>Figura 21:</b> Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo .....	45
<b>Figura 22:</b> Determinação do número de células por citometria de fluxo ....	45
<b>Figura 23:</b> Histogramas da análise do ciclo celular e determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo .....	46
<b>Figura 24:</b> Análise do ciclo celular e determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Corantes .....	19
<b>Tabela 2:</b> Soluções salinas e tampões .....	20
<b>Tabela 3:</b> Soluções de lise .....	21
<b>Tabela 4:</b> Meios de cultura .....	21
<b>Tabela 5:</b> Citotoxicidade das alcamidas sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24 e 48 horas de incubação .....	42
<b>Tabela 6:</b> Citotoxicidade das alcamidas sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24 e 48 horas de incubação .....	42

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>&amp;</b>	E
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μg</b>	Micrograma
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>°C</b>	Grau celsius
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>ANOVA</b>	Analisis of variance (Análise de variância)
<b>CAN</b>	Conteúdo de ácidos nucléicos totais
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentração inibitória média
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono (gás carbônico)
<b>CVN</b>	Captação do vermelho neutro
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal média
<b>DMEM</b>	Meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido tetracético etilenonodiamino dissódico
<b>g</b>	Gramas
<b>h</b>	Hora
<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroximetilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
<b>H/E</b>	Hematoxilina/Eosina
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IP</b>	Iodeto de propídeo
<b>J774</b>	Linhagem de macrófagos de origem murina
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Litro
<b>L929</b>	Linhagem de fibroblastos de origem murina
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligrama
<b>min</b>	Minuto

<b>mL</b>	Mililitro
<b>nm</b>	Nanômetros
<b>MTT</b>	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
<b>PBS</b>	Salina tamponada com sais de fosfato
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>q.s.p.</b>	Quantidade suficiente para
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>VN</b>	2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina
<b>X</b>	Vezes

**TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DOS ANÁLOGOS DAS RIPARINAS I, II E III UTILIZANDO MODELOS *IN VITRO*.** Dissertação de Mestrado. Autora: Alethéia Lacerda da Silveira. Orientador: Dr. Demetrius Antônio Machado Araújo. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Aprovada em: 26 de fevereiro de 2007.

## Resumo

Os estudos *in vitro* têm sido direcionados para reduzir o uso dos animais de laboratório utilizados nos testes de toxicidade, refinar os modelos toxicológicos *in vivo* e ajudar na elucidação dos mecanismos de ação da substância em nível celular e molecular. Nessas circunstâncias, os ensaios de citotoxicidade são bastante úteis, devido a sua rapidez, reprodutibilidade e baixo custo. Estudos farmacológicos demonstraram que os análogos das riparinas I, II e III apresentam várias atividades biológicas, entre as quais ação antidepressiva e antimicrobiana. Devido à ausência na literatura de estudos sobre a citotoxicidade dessas alcanidas, procurou-se avaliá-la em fibroblastos L929 e em macrófagos J774. Executaram-se, inicialmente, os ensaios de redução do sal de tetrazólio (MTT), captação do vermelho neutro (CVN) e medida do conteúdo de ácidos nucléicos totais (CAN), após períodos de 24 e 48 horas de exposição, utilizando-se as seguintes concentrações: 7,5  $\mu\text{M}$ ; 15  $\mu\text{M}$ ; 30  $\mu\text{M}$ ; 60  $\mu\text{M}$  e 120  $\mu\text{M}$ . Verificou-se, para ambas as linhagens celulares, que o período de 24 horas de incubação foi suficiente para causar os efeitos de maneira concentração-dependente nos ensaios do MTT, CAN e CVN. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  da riparina I obtidos nos experimentos de MTT, CAN e CVN foram: 33,34  $\mu\text{M}$ , 73,86  $\mu\text{M}$  e 83,96  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  da riparina II corresponderam a 26,37  $\mu\text{M}$  no ensaio do MTT, 43  $\mu\text{M}$  no teste do CAN e 65,51  $\mu\text{M}$  no método de CVN. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  da riparina III obtidos nos testes de MTT, CAN e CVN foram: 21,02  $\mu\text{M}$ , 34,10  $\mu\text{M}$  e 65,16  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Os valores de  $\text{IC}_{50}$  para o período de incubação de 48 horas foram semelhantes aos do período de 24 horas. Portanto, o ensaio do MTT apresentou-se mais sensível aos efeitos das alcanidas sobre a proliferação celular e, em todos os testes executados, a riparina III foi a mais citotóxica. Em seguida, para detectar se as alcanidas estariam promovendo a indução de eventos apoptóticos e/ou necróticos, observaram-se as alterações morfológicas utilizando-se a coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina (H/E), avaliou-se a integridade da membrana celular e a fragmentação do DNA por citometria de fluxo na linhagem celular onde foram obtidos os menores valores de  $\text{IC}_{50}$ , L929. As concentrações utilizadas foram 33,34  $\mu\text{M}$ , 26,37  $\mu\text{M}$  e 21,02  $\mu\text{M}$  para as riparinas I, II e III, respectivamente. Não foram observadas alterações morfológicas que sugerissem apoptose ou necrose. Também foi verificado que as alcanidas não promoveram perda da integridade da membrana celular, fragmentação do DNA e nem causaram parada em nenhuma das fases do ciclo celular. Conclui-se que as riparinas I, II e III têm uma baixa toxicidade *in vitro*.

**Palavras-chaves:** produtos naturais, riparinas, citotoxicidade, citometria de fluxo



**PRE-CLINICAL TOXICITY OF THE RIPARINS I, II E III ANALOGUES USING *IN VITRO* MODELS.** Master's Dissertation. Author: Alethéia Lacerda da Silveira. Advisor: Dr. Demetrius Antônio Machado Araújo. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba. Approved on february 26th, 2007.

### **Abstract**

The *in vitro* studies have been directed to reduce the use of the animals of laboratory in the test of toxicities, to refine the toxicological models *in vivo* and to help in the understating of the mechanisms of action of the substance in cellular and molecular level. In these circumstances, the cytotoxicity assays are useful because its rapidity, reproducibility and low cost. Pharmacological studies were demonstrated that riparins I, II and III were presented some biological activities, such as antidepressant and antimicrobial actions. Due to absence in the literature of studies on the cytotoxicity of these alkaloids we were looked to evaluate that toxicity in two cell lines, L929 fibroblasts and J774 macrophages like. They were executed the assays of reduction of the tetrazolium salt (MTT), uptake of the neutral red (CVN) and measure of the content of total nucleic acids (CAN), after periods of 24 and 48 hours of exposition to those riparins using the following concentrations: 7.5  $\mu\text{M}$ ; 15  $\mu\text{M}$ ; 30  $\mu\text{M}$ ; 60  $\mu\text{M}$  and 120  $\mu\text{M}$ . It was verified for both cellular cultures that the period 24-hour of incubation was enough to cause the concentration-dependent effects in the MTT, CAN and CVN assays. The obtained values of  $\text{IC}_{50}$  of the riparin I in the experiments of MTT, CAN and CVN were 33.34  $\mu\text{M}$ , 73.86  $\mu\text{M}$  and 83.96  $\mu\text{M}$ , respectively. The values of  $\text{IC}_{50}$  of riparina II had corresponded the 26.37  $\mu\text{M}$  in the assay of the MTT, 43  $\mu\text{M}$  in the test of CAN and 65.51  $\mu\text{M}$  in the CVN method. The verified  $\text{IC}_{50}$  values of riparin III in the MTT test, CAN and CVN had been 21.02  $\mu\text{M}$ , 34.10  $\mu\text{M}$  and 65.16  $\mu\text{M}$ , respectively. The value of  $\text{IC}_{50}$  for the incubation period of 48 hours had been similar to the 24 hours of incubation. Therefore, the MTT test presented more sensibility to the alkaloids effects upon the cellular proliferation and, in all executed methods, the riparin III was the most cytotoxic. Then, in order to detect if the alkaloids could be promoting the induction of apoptotic and/or necrotic events, the morphologic alterations were observed using the differential coloration for Hematoxylin/Eosin (H/E), it was evaluated the integrity of the cell membrane and the DNA fragmentation using flow cytometry in the cell line which had the lowest values of  $\text{IC}_{50}$ , L929. The concentrations used were 33.34  $\mu\text{M}$ , 26.37  $\mu\text{M}$  and 21.02  $\mu\text{M}$  for the riparins I, II and III, respectively. It was not observed morphologic changes that suggest apoptosis or necrosis. It was also verified that the alkaloids did not promote the loss of the cellular membrane integrity, DNA fragmentation, nor promote arrest in none of the stages of cellular cycle. This study permitted the conclusion that the riparins I, II and III have low toxicity *in vitro*.

**Keywords:** natural products, riparins, cytotoxicity, flow cytometry

# Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Produtos Naturais

Nos últimos anos, tem-se verificado um considerável avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (VARANDA et al., 2006). De aproximadamente 500 novas substâncias ativas aprovadas por autoridades regulatórias ao redor do mundo na década passada, perto da metade advém de fontes naturais (CRAGG et al., 1997).

Motivada, em parte, pela descoberta de fármacos eficazes como vimblastina, vincristina, campotecina, taxol, podofilotoxina e os análogos etoposido e teniposido, a indústria farmacêutica reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente, por substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI & BOLZANI, 2001). Os produtos naturais são fontes de compostos com grande diversidade química e de substâncias enantiomericamente puras, o que pode lhes conferir atividades biológicas altamente específicas, baseadas em novos mecanismos de ação (ROCHA et al., 2001).

As propriedades dos produtos naturais favorecem a interação com os alvos biológicos. Eles tendem a ter uma composição molecular diferente, contendo pouco nitrogênio, halogênio e enxofre, mas são ricos em oxigênio (ORTHOLAND & GANESAN, 2004). Além disso, os compostos de origem natural apresentam mais sistemas de anéis e maior grau de insaturação, resultando numa estrutura mais rígida que confere à molécula maior força de ligação, devido a uma menor perda entrópica (FEHER & SCHMIDT, 2003).

Com o desenvolvimento da química combinatória, banco de germoplasma e bioensaios em larga escala [high-throughput screening (HTS)], a busca por fármacos oriundos de fontes naturais tem sido realizada de maneira otimizada e racional (PHILLIPSON, 2001).

Um dos aspectos de interesse no que tange ao estudo de plantas medicinais envolve a utilização dos compostos naturais ativos como modelo

para a síntese de substâncias análogas potentes e seletivas que, algumas vezes, podem ser obtidas mais facilmente e a custos menores. A obtenção de análogos é um processo comumente utilizado para descobrir os grupamentos essenciais à atividade biológica, por meio do uso da relação entre a estrutura e a atividade biológica (FILHO & YUNES, 1998).

## 1.2 Citotoxicidade

A toxicidade é um fator limitante na liberação e consumo de fármacos. A análise da toxicidade versus atividade biológica de um fármaco, portanto, é fundamental para determinação de sua aplicabilidade terapêutica (ALMEIDA et al., 2003; MELO, P. S. et al., 2001). Por motivos éticos e financeiros, em se tratando da utilização de animais para estudos toxicológicos, os sistemas *in vitro* são importantes ferramentas utilizadas para aumentar a compreensão sobre o perfil toxicológico das substâncias químicas e prever os efeitos nocivos destas em humanos (BROADHEAD & COMBES, 2001). Um dos primeiros passos na avaliação da segurança de compostos ativos é o estudo da toxicidade aguda.

Durante os últimos anos, inúmeros esforços têm sido envidados para a redução do número de animais utilizados na avaliação da toxicidade *in vivo*. Muitos dos ensaios *in vitro* focam na injúria ou morte celular (TUSCHL & SCHWAB, 2004). Em meados dos anos 1980, os modelos toxicológicos *in vitro* tornaram-se amplamente utilizados. Eles procuram simular, até onde é possível, o ambiente *in vivo* (CARERE et al., 2002). Os sistemas celulares mais empregados na toxicologia *in vitro* incluem: culturas primárias, linhagens imortalizadas, células geneticamente modificadas, células tronco, células em diferentes estágios de diferenciação, co-culturas, culturas tridimensionais, fatias de tecido e sistemas de barreiras (ZUCCO et al., 2004).

As células respondem rapidamente ao estresse tóxico pela alteração, por exemplo, das taxas metabólicas, do crescimento celular ou da transcrição de genes que controlam as funções celulares básicas (EISENBRAND et al., 2002).

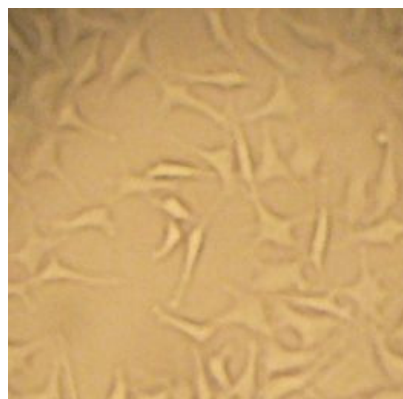
O crescimento e a divisão das células constituem o ciclo celular. Esse evento é tradicionalmente dividido em duas etapas principais: mitose e intérfase. A mitose (M) compreende os processos de separação dos cromossomos e divisão da célula em duas (citocinese). A intérfase é composta pelas fases  $G_0$ ,  $G_1$ , S (síntese) e  $G_2$  (PERES & CURI, 2005). Durante a fase  $G_1$  as células estão metabolicamente ativas, sintetizando ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. Algumas podem sair dessa fase e entrar em um estágio quiescente ou não-proliferante, denominado  $G_0$ . A replicação do ácido desoxirribonucléico (DNA) é realizada na fase S. A fase  $G_2$  caracteriza-se pelo crescimento celular e pelo acúmulo do fator promotor de maturação, necessário para alguns eventos mitóticos (HARPER & BROOKS, 2005).

A citotoxicidade basal tem sido definida como os efeitos adversos resultantes da interferência com as estruturas e/ou processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou funcionamento da célula no organismo. As funções celulares basais, geralmente, auxiliam as funções celulares órgão-específicas (BARILE et al., 1994). Os dados de citotoxicidade basal são expressos como a concentração que afeta 50% das células tratadas em relação aos controles ( $CI_{50}$ ) (CASTAÑO & GÓMEZ-LECHON, 2005).

Vários estudos empregando uma diversa gama de compostos químicos têm demonstrado uma boa correlação entre os dados de citotoxicidade basal e a toxicidade aguda em animais e humanos (CLEMEDSON et al., 2000; GARLE et al., 1994). A razão em se relacionar a citotoxicidade *in vitro* com a toxicidade aguda *in vivo* é porque as doses letais das substâncias matam por meio de efeitos tóxicos em nível celular. Sendo assim, os ensaios de citotoxicidade basal podem ser considerados como o ponto de partida para uma avaliação integrada do potencial tóxico das substâncias *in vivo* (CASTAÑO & GÓMEZ-LECHON, 2005).

Dependendo da sensibilidade do ensaio de citotoxicidade, da linhagem celular utilizada e do período de exposição, o valor de  $DL_{50}$  pode ser estimado com base no valor de  $CI_{50}$ . No entanto, outros ensaios *in vitro* são necessários para indicar como este potencial tóxico pode ser afetado pela farmacocinética da substância, bem como para prover informações adicionais sobre a avaliação de risco obtida nos estudos de toxicidade aguda *in vivo* (BOTHAM, 2002).

Linhagens celulares de mamíferos são comumente utilizadas em estudos de citotoxicidade basal (SPIELMANN et al., 1999). Os fibroblastos L929 (figura 1), oriundos do tecido conjuntivo de camundongos, são uma linhagem celular bem caracterizada e utilizada para o “screening” de substâncias que possuem algum potencial citotóxico (CHEN et al., 2004). Os macrófagos J774 (figura 2), oriundos do sarcoma da região axilar de camundongos, também são bastante usados em estudos de citotoxicidade basal (SOUZA, A. O., 2004).



**Figura 1:** Fibroblastos L929. Aumento de 400 vezes. Fonte: SILVEIRA, 2007



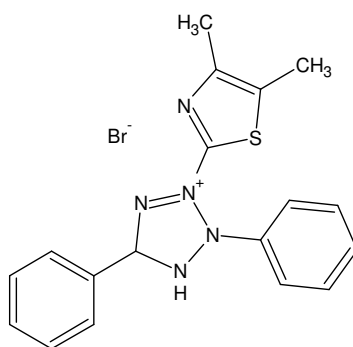
**Figura 2:** Macrófagos J774. Aumento de 400 vezes. Fonte: SILVEIRA, 2007

Os experimentos de citotoxicidade servem para avaliar as características toxicológicas de novos compostos em seus estágios iniciais de desenvolvimento, bem como permitem decidir quais experimentos *in vivo* deverão ser realizados e quais são os órgãos ou organelas mais afetadas

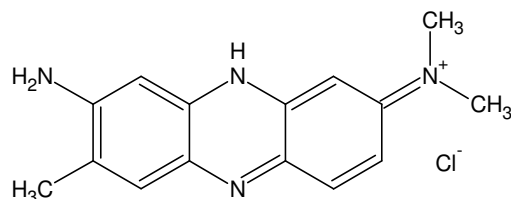
(MELO, P. S. et al., 2004; STARK et al., 1986). Algumas vantagens desses testes sobre os ensaios toxicológicos *in vivo* incluem: alta reprodutibilidade, simplicidade, rapidez, uso de pequenas quantidades de droga e diminuição dos custos, com a consequente redução do número de animais utilizados nos estudos de toxicidade (CHU, 1995; MELO, P. S. et al., 2000).

Vários parâmetros que avaliem alvos diferentes devem ser abrangidos nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Os mais frequentemente utilizados são: inibição da proliferação celular, redução da função metabólica, danos à membrana celular, danos a organelas e alterações morfológicas. Esses parâmetros foram estabelecidos ao longo de vários anos e em muitos tipos celulares (BORENFREUND et al., 1988; EISENBRAND et al., 2002; MELO, P. S. et al., 2003).

Métodos quantitativos são bem recomendados para a realização de estudos toxicológicos em nível celular (DUFRANE et al., 2001). Alguns testes, como por exemplo, a redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (figura 3), a captação do 2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina (Vermelho neutro, figura 4) e o conteúdo de ácidos nucléicos totais (CAN) adquiriram considerável atenção como indicativos de citotoxicidade (MELO, P. S. et al., 2006). Esses ensaios fornecem informações sobre diferentes funções ou compartimentos celulares (DE CONTI et al., 1998; VALENTIN et al., 2001) e são executados em vários sistemas celulares (VIAN et al., 1995).



**Figura 3:** Estrutura química do MTT



**Figura 4:** Estrutura química do vermelho neutro

A toxicidade é um evento complexo que apresenta um amplo espectro de efeitos, envolvendo desde alterações funcionais e metabólicas até a morte celular (EISENBRAND et al., 2002). A principal subdivisão da morte celular é em apoptose ou necrose.

A apoptose é um tipo de morte celular programada cuja finalidade é a eliminação de células indesejáveis ou desnecessárias ao organismo, mediante a ativação de um programa bioquímico internamente controlado que requer energia e não envolve inflamação. Já a necrose está relacionada com agressões severas que envolvem inflamação e promovem danos aos tecidos vizinhos (PERES & CURI, 2005).

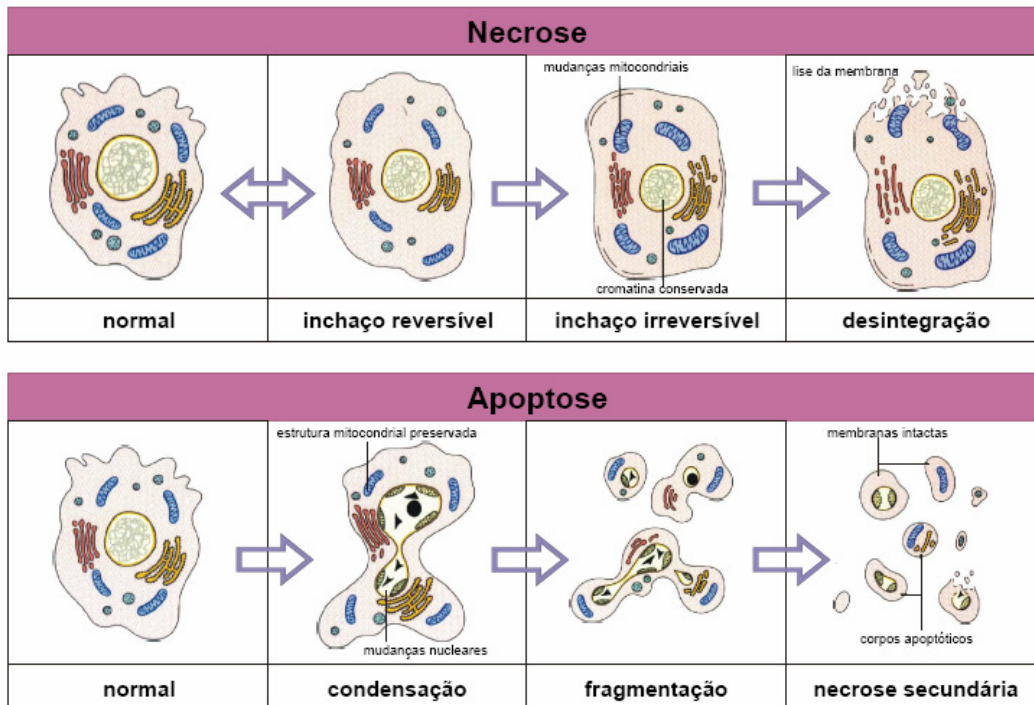
Injúrias reversíveis ou irreversíveis levam a apoptose ou necrose, dependendo de quão duradouro e/ou intenso seja o estresse ao qual a célula é submetida (CONTRAN et al., 2000). Agentes que causam lesões mais brandas ou que estejam mais diluídos geralmente desencadeiam a apoptose; por outro lado, lesões mais intensas ou agentes mais concentrados levam à necrose (KROEMER et al., 1998). Estudos revelam que apoptose e necrose não são necessariamente caminhos patológicos diferentes, pois podem apresentar os mesmos mensageiros, ativadores e inibidores (FORMIGLI et al., 2000).

A classificação da morte celular é definida primordialmente segundo critérios morfológicos, sendo substanciada por aspectos bioquímicos (PERES & CURI, 2005).

Dentre as principais características morfológicas do processo necrótico (figura 5) destacam-se o inchaço da célula, a perda da integridade da membrana, o aparecimento de vacúolos e o rompimento celular (MCCONKEY, 1998). Nas etapas finais da necrose, quando todas as organelas se desfazem, as células ficam com aspecto diáfano e são chamadas de "ghost cells" (PERES & CURI, 2005).



Células apoptóticas podem ser identificadas pelas seguintes mudanças morfológicas: encolhimento celular, condensação e marginalização da cromatina citoplasmática e lise celular. Subseqüentemente, a célula torna-se fragmentada em compactas estruturas membranosas que são, posteriormente, fagocitadas por macrófagos (figura 5) (SCHATTENBERG et al., 2006; ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).



**Figura 5:** Principais diferenças morfológicas entre as mortes celulares apoptótica e necrótica. Adaptada de: [www.bioagency.com.br/catalogos/09\\_apoptose.pdf](http://www.bioagency.com.br/catalogos/09_apoptose.pdf)

A citometria de fluxo tem sido bastante útil nos estudos do mecanismo de morte celular por ser uma técnica rápida e precisa que é capaz de determinar diferentes características das partículas biológicas (HU et al., 2005). A identificação das células apoptóticas ou necróticas é feita por intermédio da análise das mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante tais processos.

### **1.3 Aspectos botânicos, químicos e etnofarmacológicos de *Aniba riparia* (Ness) Mez**

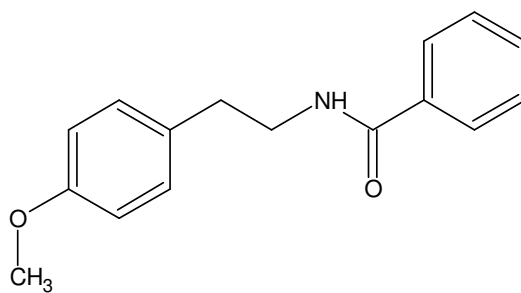
A família Lauraceae apresenta-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Inclui cerca de 50 gêneros e 2.500 espécies, ocorrendo no Brasil 25 gêneros e cerca de 400 espécies. Esta é uma das famílias de maior destaque na composição florística de grande parte dos ecossistemas florestais do país, em especial, da mata Atlântica e em florestas da Região Sul. Nestes ecossistemas é, frequentemente, uma das mais representativas, tanto em número de espécies quanto de indivíduos (SOUZA & LORENZI, 2005).

As Lauraceae destacam-se entre as demais famílias pela sua importância econômica. Algumas espécies têm sido utilizadas na culinária, na fabricação de papel, em marcenaria e construção civil, na indústria de cosméticos e na medicina popular (MARQUES, C. A., 2001).

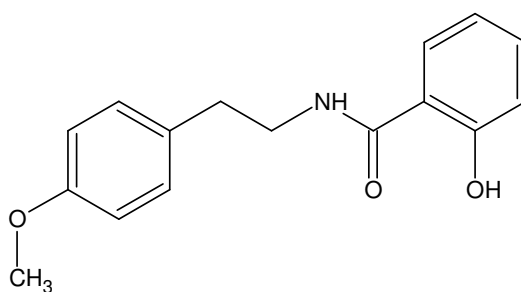
Dentre as espécies medicinais, merecem destaque as pertencentes ao gênero *Aniba*. Esse é composto por aproximadamente 41 espécies que se distribuem na América Central, Antilhas e, principalmente, América do Sul. A maior concentração do número de espécies encontra-se na região das Guianas e na Amazônia Central. No Brasil, o gênero é representado por cerca de 25 espécies, dentre elas a *Aniba riparia* (Ness) Mez (QUINET & ANDREATA, 2002).

A espécie *Aniba riparia* (Ness) Mez é típica da região amazônica, sendo popularmente conhecida como louro amarelo (BARBOSA et al., 1988). Seus frutos contêm diversos constituintes químicos, como por exemplo, flavonóides, neolignanas, stírilpironas e alcanidas (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Esta última classe de substância tem sido fonte de interesse de pesquisadores na busca de novas fontes vegetais de princípios farmacologicamente ativos (CASTELO-BRANCO, 1992).

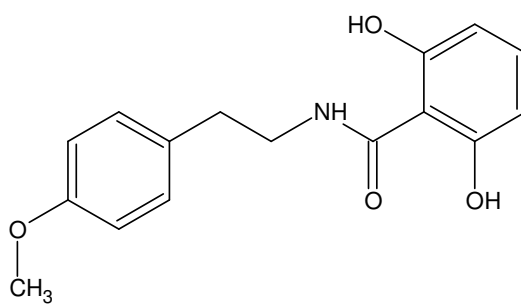
Éteres metílicos de N-benzoiltiramina (riparina I) (figura 6), de N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II) (figura 7) e N-(2,6-dihidroxibenzoil)-tiramina (riparina III) (figura 8), isoladas dos frutos de *Aniba riparia* (Ness) Mez, apresentam diversas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, antimalárica, schistosomicida e moluscicida (CASTELO-BRANCO, 1992).



**Figura 6:** Estrutura química da riparina I



**Figura 7:** Estrutura química da riparina II



**Figura 8:** Estrutura química da riparina III

### **1.3.1 Aspectos farmacológicos dos análogos sintéticos das riparinas I, II e III**

A importância da síntese de produtos naturais biologicamente ativos consiste na busca de uma maior economia de tempo e melhor aproveitamento dos recursos financeiros e naturais. Além disso, modificações na estrutura química de derivados sintéticos podem favorecer o desenvolvimento de fármacos mais seguros e seletivos.

As riparinas I, II e III foram isoladas e sintetizadas, pela primeira vez, no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (BARBOSA-FILHO et al., 1987; BARBOSA-FILHO et al., 1990).

Foi demonstrado que essas três alcanidas são capazes de induzir, de forma não específica e reversível, o relaxamento das contrações produzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia e por ocitonina e bradiginina em útero de rata virgem, com valores de  $CI_{50}$  variando de 1,7 - 5,0  $\mu\text{g/mL}$ . A riparina III foi, em geral, duas vezes mais potente que as riparinas I e II, as quais tiveram potências semelhantes. A riparina III, também, promoveu um relaxamento em traquéia de cobaia, com  $CI_{50}$  igual a 1,9  $\mu\text{g/mL}$  (CASTELO-BRANCO et al., 2000). Esse efeito relaxante deve-se principalmente à inibição do influxo de íons cálcio para o meio intracelular e a inibição da liberação dos estoques intracelulares de cálcio, não envolvendo a participação da geração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (THOMAS et al., 1994).

As riparinas I e III, nas doses de 25 e 50 mg/kg, via intraperitoneal, protegeram parcialmente as convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos (MONTEIRO et al., 2005). Esta mesma ação, também, foi promovida pela administração oral e intraperitoneal das mesmas doses de riparina II (LEITE et al., 2006).

Um efeito ansiolítico foi observado utilizando-se os testes do campo aberto, "rota rod" e "plus maze" em camundongos, quando as riparinas I e III foram administradas nas doses de 25 e 50 mg/kg, vias oral e intraperitoneal (SOUZA, F. C. F. et al., 2004; SOUZA, F. C. F. et al., 2005; MELO, C. T. V. et al., 2006). Para a riparina II, esse efeito foi obtido apenas quando foi administrada oralmente (MELO, C. T. V. et al., 2005).

As riparinas I e II apresentaram uma ação antidepressiva em camundongos, nas doses de 25 e 50 mg/kg, administradas oralmente, efeito demonstrado nos testes do nado forçado e suspensão da cauda em camundongos (MELO, C. T. V. et al., 2005). A riparina III, também, promoveu o mesmo efeito, quando administrada nas mesmas doses, pelas vias oral e intraperitoneal (SOUZA, F. C. F. et al., 2004).

As riparinas II e III foram capazes de causar uma diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos acordados e não estressados, nas doses de 1 mg/Kg, via intraperitoneal. Em átrio isolado, a riparina III, na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M, causou uma inibição da frequência atrial e da força de contração. Esse efeito hipotensor e bradicárdico é devido a uma ação que parece envolver, principalmente, um componente de origem parassimpática em nível cardíaco (SEIXAS, 1996).

Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes mostraram-se susceptíveis à ação das riparinas I e III, sendo que esta última foi quem apresentou um maior potencial antimicrobiano (CATÃO et al., 2005).

Uma atividade antiinflamatória, nos testes de formalina e edema de pata induzido por carragenina, foi observada pela administração intraperitoneal de riparina I nas doses de 25 e 50 mg/kg (ARAÚJO et al., 2006). Uma ação analgésica dessa alcanida também foi apresentada, no teste de contorções abdominais em camundongos, nas doses de 25 e 50 mg/kg, via oral (ARAÚJO et al., 2006).

Não foram encontrados na literatura estudos sobre a citotoxicidade das riparinas I, II e III. Devido a seus efeitos antimicrobiano, antimalárico, schistossomicida e moluscicida, o presente trabalho não obstante se propõe a verificar o potencial citotóxico dessas alcanidas sobre as linhagens celulares L929 e J774.

# Objetivos

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar e comparar a citotoxicidade dos análogos das riparinas I, II e III utilizando métodos *in vitro*.

### **2.2 Específicos**

2.2.1 Implantar na UFPB os ensaios de captação do vermelho neutro (CVN) e medida do conteúdo de ácidos nucléicos totais (CAN);

2.2.2 Avaliar e comparar a citotoxicidade basal das riparinas I, II e III sobre as linhagens L929 e J774, nos períodos de 24 e 48 horas, utilizando três diferentes parâmetros: MTT, CVN e CAN;

2.2.3 Observar qual o método apresenta-se mais sensível aos efeitos citotóxicos das drogas;

2.2.4 Verificar em qual tipo celular ocorre uma maior citotoxicidade e se esta é dependente de concentração e de tempo;

2.2.5 Visualizar, nas células da linhagem onde foi detectado um maior efeito citotóxico, as alterações morfológicas produzidas pelas alcanidas, por meio da coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina;

2.2.6 Analisar, nas células da linhagem onde foi detectado um maior efeito citotóxico das riparinas, a integridade da membrana celular, o ciclo celular e a fragmentação do DNA por citometria de fluxo.

# Materiais e Métodos



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MATERIAIS**

##### **3.1.1 Equipamentos**

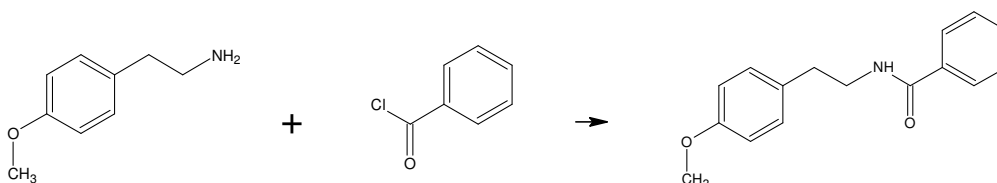
- Agitador de placa Certomat<sup>®</sup> MO
- Autoclave Fable – Primar
- Banho Maria Quimis
- Centrífuga Excelsa Baby FANEM
- Centrífuga de lâminas Shandon Southern Cytospin
- Citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini Sistem, Guava Technologies
- Deionizador de Água Milli-Q plus Millipore
- Destilador GFL
- Espectrofotômetro Beckman DU<sup>®</sup> 640
- Estufa de secagem FANEM
- Fluxo laminar VECO
- Freezer Esmaltec
- Geladeira Eletrolux
- Incubadora de células Sanyo
- Leitor de ELISA BIO-RAD
- Microscópio de fluorescência Olympus
- Microscópio ótico de inversão Hund Wetzlar
- Medidor de pH 330i WTW
- Vortex Certomat<sup>®</sup> MU

### 3.1.2 Substâncias testes

#### 3.1.2.1 Obtenção dos compostos sintéticos

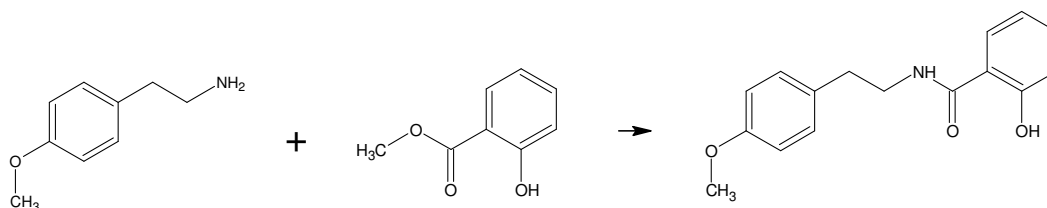
As alcaloides foram cedidas pelo Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho.

A síntese da riparina I se deu pelo acoplamento do éter metílico da tiramina com o cloreto de benzoíla (figura 9), sendo posteriormente purificada por métodos cromatográficos (cromatografia em coluna e em camada delgada) e identificada por métodos espectroscópicos (ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear). O rendimento da reação foi de 64%. (SEIXAS, 1996).



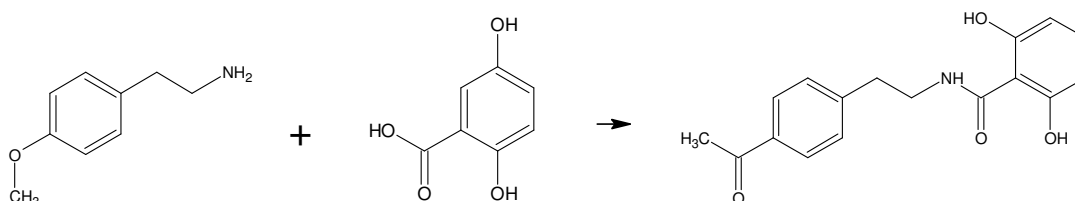
**Figura 9:** Reação de síntese da riparina I

A obtenção da riparina II foi por meio do acoplamento do éter metílico da tiramina com o salicilato de metila (figura 10), sendo posteriormente purificada por métodos cromatográficos (cromatografia em coluna e em camada delgada) e identificada por métodos espectroscópicos (ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear). O rendimento da reação foi de 15%. (SEIXAS, 1996).



**Figura 10:** Reação de síntese da riparina II

A riparina III foi formada pelo acoplamento do éter metílico da tiramina com o ácido 2,6-dihidroxibenzoico (figura 11), sendo posteriormente purificada por métodos cromatográficos (cromatografia em coluna e em camada delgada) e identificada por métodos espectroscópicos (ultravioleta, infravermelho e ressonância magnética nuclear). O rendimento da reação foi de 30 %. (SEIXAS, 1996).



**Figura 11:** Reação de síntese da riparina III

### 3.1.2.2 Preparo das soluções estoques

As soluções estoques de 2 mM das alcaloides foram obtidas pela diluição destas em etanol e salina tamponada com sais de fosfato (PBS). A concentração de etanol não foi maior que 1%. Antes dos experimentos, as drogas (previamente filtradas em membrana esterilizante - 0,22  $\mu\text{m}$  de porosidade) eram diluídas em meio de cultura, a partir da solução estoque. As concentrações utilizadas nos ensaios foram as seguintes: 7,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  e 120  $\mu\text{M}$ , as quais foram escolhidas por estudos prévios realizados em nosso laboratório.

### 3.1.3 Soluções e Reagentes

**Tabela 1:** Corantes

NOMES	CONCENTRAÇÕES
Azul de tripan	1 g de azul de tripan PBS q.s.p. 100mL
Eosina	0,5 g de eosina 80 mL de etanol 0,5 mL de ácido acético Água destilada q.s.p. 20 mL
Hematoxilina	0,5 g de hematoxilina 10 mL de glicerina 25 g de sulfato de alumínio 0,1 g de iodeto de potássio Água destilada q.s.p. 500 mL
Iodeto de propídio	2 µg de iodeto de propídio PBS q.s.p. 1mL
MTT	5 mg de MTT PBS q.s.p. 1mL
Vermelho neutro	0,5 mg de vermelho neutro PBS q.s.p. 1mL

**Tabela 2:** Soluções salinas e tampões

<b>NOMES</b>	<b>CONCENTRAÇÕES</b>
Salina tamponada com sais de fosfato (PBS)	8 g de cloreto de sódio
	0,2 g de cloreto de potássio
	0,122 g de fosfato de potássio monobásico
	1,716 g de fosfato de sódio dibásico
	Água destilada q.s.p. 1000 mL
Tampão fosfato-salina Dulbecco (PBS – Dulbecco)	8 g de cloreto de sódio
	0,2 g de cloreto de potássio
	0,1 g de cloreto de cálcio
	0,1 g de cloreto de magnésio hexahidratado
	0,91 g de fosfato de sódio monobásico
	0,2 g de fosfato de potássio monobásico
	Água destilada q.s.p. 1000 mL
Tampão de lise para análise de fragmentação do DNA	0,1 g de citrato de sódio
	0,1 mL de triton X-100
	200 mg de iodeto de propídio
	Água destilada q.s.p. 100 mL

**Tabela 3:** Soluções de lise

NOMES	CONCENTRAÇÕES
Dodecil sulfato de sódio	10 µL de ácido clorídrico
	10 g de SDS
	Água destilada q.s.p. 100 mL
Solução de lise para o ensaio de CVN	1 mL de ácido acético
	49 mL de etanol absoluto
	Água destilada q.s.p. 100 mL
Triton X-100	1 mL de triton X-100
	Água destilada q.s.p. 100 mL

**Tabela 4:** Meios de cultura

NOMES	CONCENTRAÇÕES
Meio DMEM alta glicose sem vermelho de fenol	1,19 g de HEPES
	2,3 g de bicarbonato de sódio
	5 mL da mistura de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL)
	10% de soro bovino fetal
	Água milli - Q q.s.p. 1000 mL
Meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol	1,19 g de HEPES
	2,3 g de Bicarbonato de sódio
	5 mL da mistura de penicilina (10.000 UI/mL) e estreptomicina (10 mg/mL)
	10% de soro bovino fetal
	Água milli - Q q.s.p. 1000 mL

### **3.1.4 Modelo biológico experimental**

A linhagem macrófaga J774 (TIB-67, American Type Culture Collection) foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro. A linhagem fibroblástica L929 (CCL-1, American Type Culture Collection) foi cedida pelo Prof. Dr. Jader do Santos Cruz, do Laboratório de Membranas Excitáveis/Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As células cresceram em frascos estéreis para cultivo celular (25 cm<sup>2</sup>) contendo meio DMEM, no caso dos fibroblastos L929, ou meio RPMI 1640, no caso dos macrófagos J774. Os frascos foram mantidos em incubadora de células a uma atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura controlada de 37°C.

O crescimento celular foi monitorado, diariamente, em microscópio ótico invertido. O meio de cultura era trocado, geralmente, a cada dois dias. Quando as células atingiam confluência, era realizado um processo de tripsinização com uma solução de tripsina - EDTA (0,25% / 0,02%).

Todos os procedimentos do cultivo foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo-se todos os protocolos para assegurar ausência de contaminação dos materiais.

Antes da realização dos experimentos, as células eram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o reagente azul de tripan. Este corante é excluído do citoplasma de células viáveis; já as mortas são incapazes de excluí-lo e aparecem azuis. A proporção entre o número de células vivas e o total (vivas e mortas) fornece uma porcentagem de viabilidade celular, que deve ser superior a 90%.

## **3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **3.2.1 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE BASAL**

#### **3.2.1.1 Redução do sal de tetrazólio (MTT)**

A redução do MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para avaliar a citotoxicidade de muitos compostos (POZZOLINE et al., 2003). Este sal de tetrazólio amarelo solúvel é captado por um processo de endocitose, sendo convertido por células metabolicamente ativas em um composto formazam azul insolúvel, através da redução do anel heterocíclico de tetrazólio. Essa reação de redução é intermediada, em parte, pelas desidrogenases mitocondriais (BERRIDGE & TAN, 1993; LIU et al., 1997). Os cristais de formazam podem ser então dissolvidos e quantificados espectrofotometricamente (FREIMOSER et al., 1999). O valor da absorvância desse composto guarda uma proporção com o número de células viáveis (SERRANO et al., 2004).

#### Procedimento experimental:

As células foram semeadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em placas com 96 poços, utilizando-se meio DMEM ou RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos (penicilina/estreptomicina, ver tabela 4). As substâncias foram adicionadas aos poços em quadruplicata, 24 horas após o plaqueamento, nas seguintes concentrações: 7,5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M e 120  $\mu$ M. Realizou-se o controle (200  $\mu$ L de células e meio/poço) e o branco (200  $\mu$ L de dodecil sulfato de sódio [SDS]/poço). As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37 °C por 24 ou 48 horas. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, lavaram-se os poços com PBS e colocou-se MTT a 0,5 mg/mL. Passando-se 4 horas, o sobrenadante foi removido e acrescentou-se SDS para solubilizar os cristais de formazam. Após 15 horas, a absorvância foi medida a 570 nm em leitor tipo ELISA.



### **3.2.1.2 Captação do vermelho neutro (CVN)**

Ao nível subcelular, o sistema lisossomal tem sido identificado como um alvo dos efeitos tóxicos de certas substâncias (SVENDSEN et al., 2004). A técnica de CVN baseia-se no uso do vermelho neutro, um fraco corante catiônico que se liga por ligações hidrofóbicas eletrostáticas em sítios aniônicos e/ou grupos fosfato na matriz lisossomal das células vivas (MELO, P. S. et al., 2000; THORNTON et al., 1995). A exposição a um agente tóxico que altere a superfície celular ou a membrana lisossomal promove o escoamento desse corante (RENZI et al., 1993). A quantidade de vermelho neutro, retida no lisossomo, é então determinada espectrofotometricamente. Este ensaio tem sido extensivamente utilizado, por ser simples, sensível e econômico (MELO, P. S. et al., 2003).

#### Procedimento experimental:

As células foram semeadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em placas com 96 poços, utilizando-se meio DMEM ou RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos (penicilina/estreptomicina, ver tabela 4). As substâncias foram adicionadas aos poços em quadruplicata, 24 horas após o plaqueamento, nas seguintes concentrações: 7,5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M e 120  $\mu$ M. Realizou-se o controle (200  $\mu$ L de células e meio/poço) e o branco (200  $\mu$ L da solução de lise/poço). As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 ou 48 horas. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, lavaram-se os poços com PBS e colocou-se o vermelho neutro a 50  $\mu$ g/mL, previamente incubado por 12 horas e filtrado em membrana esterilizante. Passando-se 4 horas, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com PBS - Dulbecco para eliminar o excesso de corante extracelular. Em seguida, foi acrescentada a solução de lise, com a finalidade de extrair o vermelho neutro incorporado nos lisossomos. A placa foi agitada por 30 minutos e a absorbância foi medida a 570 nm, em leitor tipo ELISA.

### **3.2.1.3 Conteúdo de ácidos nucléicos totais (CAN)**

A variação do número celular é um indicativo de toxicidade que geralmente é determinado pela quantidade dos componentes macromoleculares (DNA, RNA e proteínas). O CAN é um método útil para quantificar as mudanças na densidade celular, visto que explora a absorvância no ultravioleta dos ácidos nucléicos (CINGI et al., 1991). Os níveis de DNA podem ser medidos a 260 nm. Dessa forma, a relação com 50 µg DNA/mL gera o valor de absorvância igual a 1 quando medido a um comprimento de onda de 260 nm (CORRÊA et al., 2005; MELO, P. S. et al., 2006).

#### Procedimento experimental:

As células foram semeadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em placas com 96 poços, utilizando-se meio DMEM ou RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos (penicilina/estreptomicina, ver tabela 4). As substâncias foram adicionadas aos poços em quadruplicata, 24 horas após o plaqueamento, nas seguintes concentrações: 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM e 120 µM. Realizou-se o controle (200 µL de células e meio/poço) e o branco (200 µL de hidróxido de sódio [NaOH]/poço). As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 ou 48 horas. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, lavaram-se os poços com PBS e colocou-se ácido tricloroacético a 5% para fixar as células. Após 15 minutos, foi adicionado etanol (90%) a frio para que o “pool” de nucleotídeos solúveis fosse extraído. Efetuaram-se duas lavagens com etanol gelado. Em seguida, as monocamadas celulares foram digeridas com 0,5 M de NaOH a temperatura ambiente, durante 2 horas. A absorvância da fração NaOH foi mensurada a 260 nm em espectrofotômetro.

#### **3.2.1.4 Análise dos dados**

Os dados foram obtidos por meio de três ensaios e cada concentração foi testada em quadruplicata. Foi registrado o gráfico da absorbância versus concentração e os dados foram analisados por Análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls, sendo considerados significativos se  $p < 0,05$ . Foram determinadas as  $CI_{50}$  e respectivos intervalos de confiança (IC 95%), a partir de regressão não-linear. Os resultados foram comparados por meio do Teste  $t$  não-pareado ou por ANOVA e considerados significantes se  $p < 0,05$ . O programa estatístico utilizado para a análise dos dados e para a construção dos gráficos foi o Prism versão 4.0 (GraphPad Software).

### 3.2.2 ESTUDO DO MODO DE AÇÃO

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Para a execução de cada teste, os fibroblastos L929 foram semeados numa concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços, utilizando-se meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos (penicilina/estreptomicina, ver tabela 4). As substâncias foram adicionadas aos poços em quadruplicata, 24 horas após o plaqueamento. As concentrações utilizadas corresponderam aos valores de  $IC_{50}$  obtidos no ensaio de MTT, no período de 24 horas.

Passando-se 24 horas de incubação com as substâncias, foram realizados os ensaios de análise morfológica, determinação da integridade da membrana celular e avaliação do ciclo celular e da fragmentação do DNA em citômetro de fluxo (figura 12).



**Figura 12:** Citômetro de fluxo utilizado nos ensaios de determinação da integridade da membrana celular, avaliação do ciclo celular e fragmentação do DNA

### **3.2.2.1 Análise morfológica: Coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina**

A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma, conferindo-lhe uma coloração rósea. Desta forma, a coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear e citoplasmática (VERAS et al., 2004).

#### Procedimento experimental:

Passando-se o período de 24 horas de incubação com as substâncias, 50 µL da suspensão de células foram adicionados à centrífuga de lâmina (cytospin) e centrifugados a 1000 rpm/5 min. Após a adesão das células na lâmina, a fixação das mesmas foi feita com metanol (100%), por 1 minuto. Em seguida, a lâmina foi colocada - por 20 segundos - em um tubo contendo hematoxilina. Após a retirada do excesso de corante e a observação em microscópio ótico, a lâmina foi corada com eosina por 20 segundos. Retirou-se o excesso de corante antes da visualização das lâminas por microscopia.

#### *3.2.2.1.1 Análise dos dados*

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio ótico para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

### **3.2.2.2 Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo – Viabilidade celular**

Esse teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo em penetrar nas células cuja membrana esteja rompida e após a ligação com o DNA emitir alta fluorescência quando excitado pelo laser. Células com membrana íntegra não permitem a entrada do iodeto de propídeo, portanto, apresentam baixa fluorescência (PERES & CURI, 2005).

#### Procedimento experimental:

Passando-se o período de 24 horas de incubação com as substâncias, as células foram recolhidas (80 µL) e colocadas em um tubo tipo “ependorf”. Adicionou-se 80 µL da solução de iodeto de propídeo e incubou-se por 5 minutos, antes da leitura no citômetro de fluxo.

#### *3.2.2.2.1 Análise dos dados*

Os dados foram obtidos por meio de três ensaios e cada concentração foi testada em quadruplicata. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA seguida por Student Newman-Keuls, com o nível de significância de 5%.

### **3.2.2.3 Análise do ciclo celular e da fragmentação do DNA por citometria de fluxo**

Esse ensaio baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP) ligar-se ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o IP possa se ligar ao núcleo. Células com o núcleo íntegro emitem alta fluorescência; já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos IP e, por isso, emitem menor fluorescência (NICOLLETTI, 1997).

#### Procedimento experimental:

Passando-se o período de 24 horas de incubação com as substâncias, as células foram recolhidas (80 µL) e colocadas em um tubo tipo “eppendorf”. Adicionou-se 80 µL do tampão de lise e incubou-se por 5 minutos antes da leitura no citômetro de fluxo.

#### *3.2.2.3.1 Análise dos dados*

Os dados foram obtidos por meio de três ensaios e cada concentração foi testada em quadruplicata. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA seguida por Student Newman-Keuls, com o nível de significância de 5%.

# Resultados



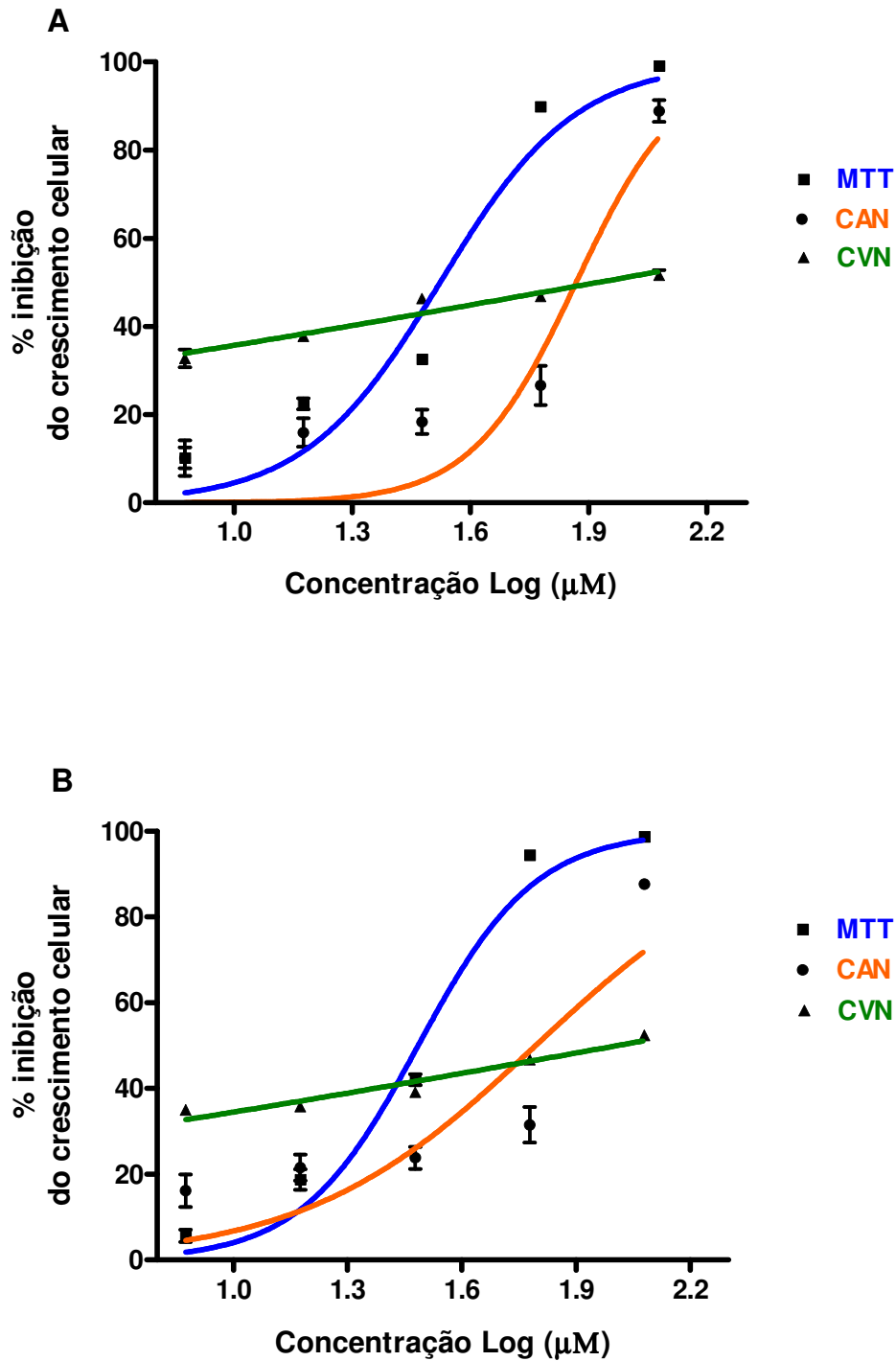
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaios de citotoxicidade basal

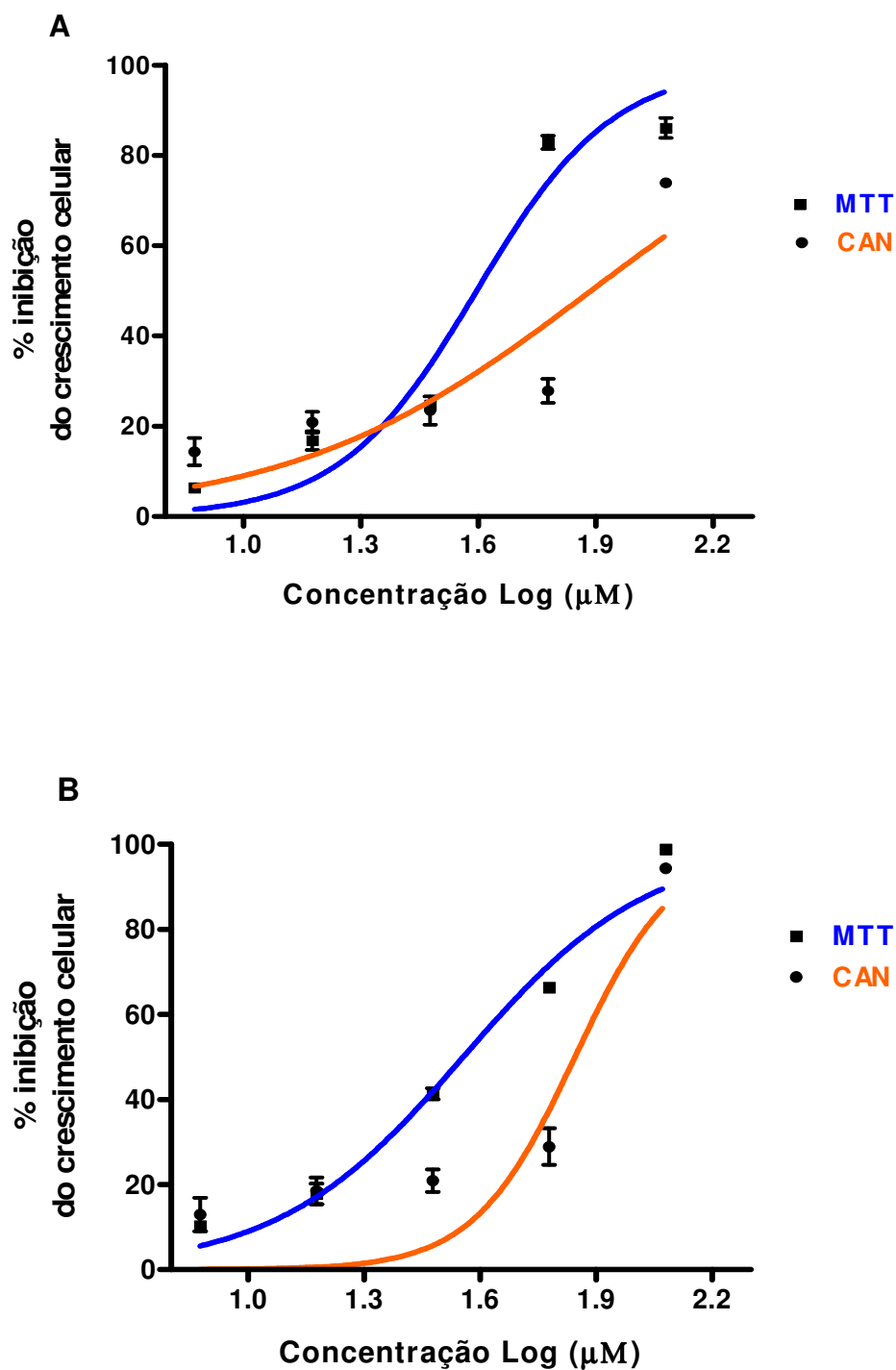
O potencial citotóxico das riparinas I, II e III foi avaliado nas linhagens L929 e J774 por meio dos ensaios de redução do sal de tetrazólio (MTT), conteúdo de ácidos nucleicos totais (CAN) e captação do vermelho neutro (CVN), em períodos de 24 e 48 horas de incubação. As concentrações das alcanidas utilizadas nos experimentos foram as seguintes: 7,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  e 120  $\mu\text{M}$ . Registraram-se os gráficos da absorbância versus concentração e foram determinadas as  $\text{CI}_{50}$  e respectivos intervalos de confiança, a partir de regressão não-linear. Para a linhagem J774 não foi possível calcular os valores de  $\text{CI}_{50}$  obtidos no teste de CVN.

A figura 13 mostra a citotoxicidade da riparina I sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, em períodos de 24 e 48 horas. No tempo de incubação de 24 horas, as  $\text{CI}_{50}$  da alcanida obtidas nos experimentos de MTT, CAN e CVN foram respectivamente: 33,34  $\mu\text{M}$ , 73,86  $\mu\text{M}$  e 83,96  $\mu\text{M}$ . No período de 48 horas de exposição, os valores de  $\text{CI}_{50}$  corresponderam a 30,56  $\mu\text{M}$  para o ensaio de MTT, 62,18  $\mu\text{M}$  no teste do CAN e 101,84  $\mu\text{M}$  para o método de CVN.

O efeito citotóxico da riparina I sobre a linhagem J774, determinado nos métodos de MTT e CAN, em períodos de 24 e 48 horas, é apresentado na figura 14. No tempo de incubação de 24 horas, as  $\text{CI}_{50}$  da alcanida obtidas nos experimentos de MTT e CAN foram, respectivamente, as seguintes: 39,42  $\mu\text{M}$  e 77,24  $\mu\text{M}$ . No período de 48 horas de exposição, os valores de  $\text{CI}_{50}$  corresponderam a 35,97  $\mu\text{M}$  para o teste do MTT e 69,97  $\mu\text{M}$  no ensaio do CAN.



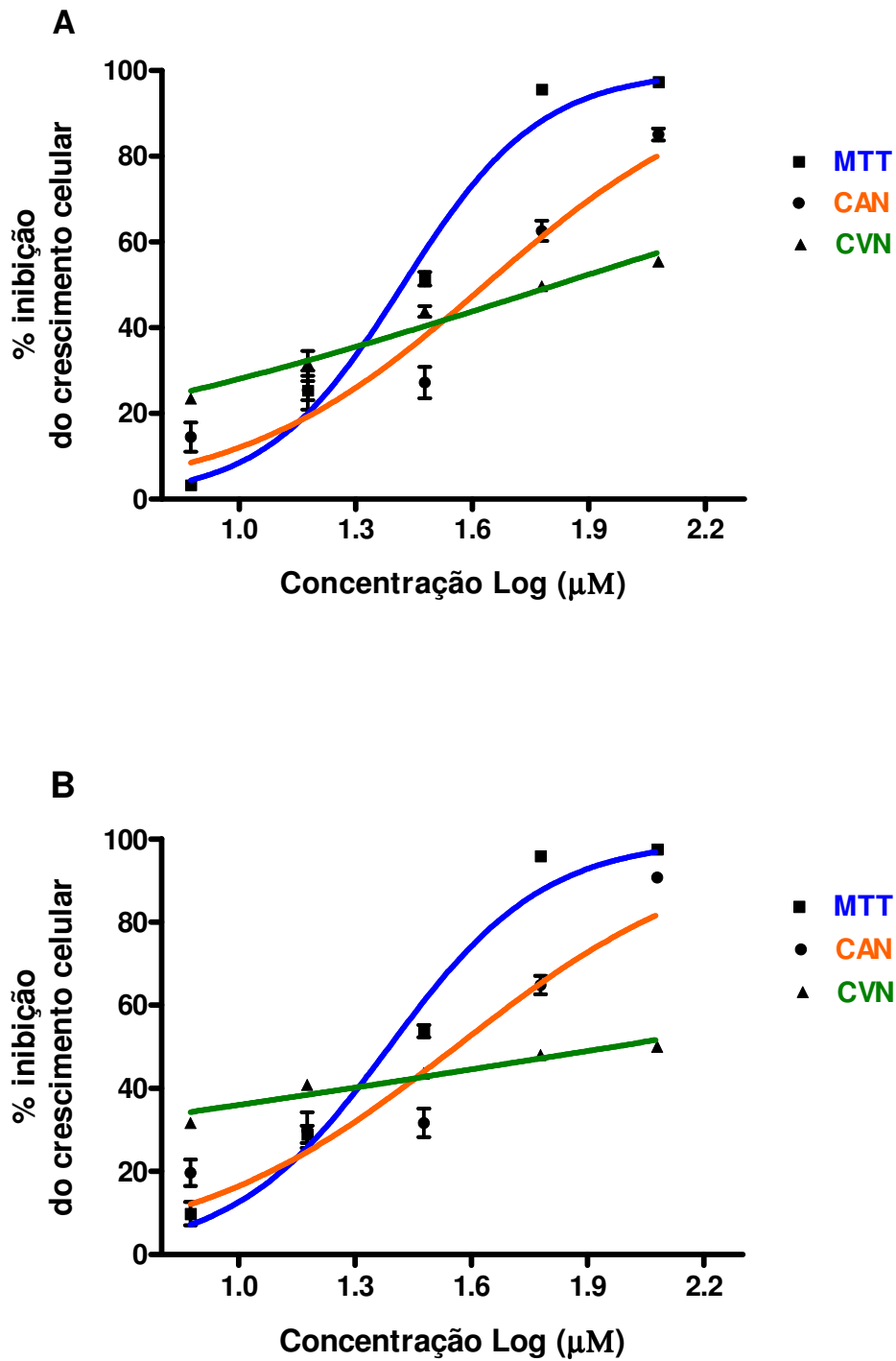
**Figura 13:** Citotoxicidade da riparina I sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicata. As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.



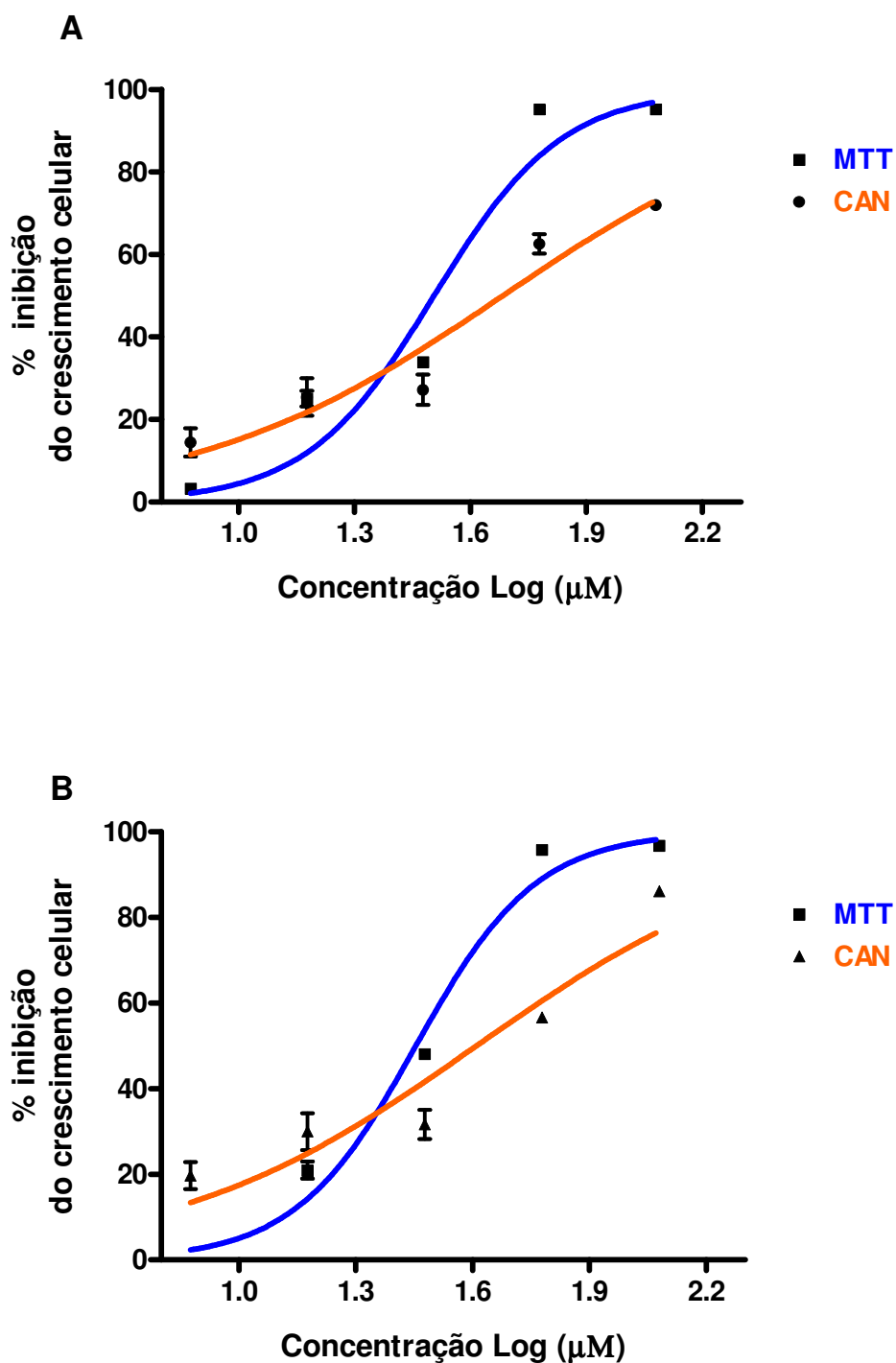
**Figura 14:** Citotoxicidade da riparina I sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicata. As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

Na figura 15 é mostrado o efeito citotóxico da riparina II sobre a linhagem L929, avaliado pelos métodos de MTT, CAN e CVN, em períodos de 24 e 48 horas. No tempo de incubação de 24 horas, as  $CI_{50}$  da alcamida obtidas nos experimentos de MTT, CAN e CVN foram respectivamente: 26,37  $\mu\text{M}$ , 43  $\mu\text{M}$  e 65,51  $\mu\text{M}$ . No período de 48 horas de exposição, os valores de  $CI_{50}$  corresponderam a 24,45  $\mu\text{M}$  no ensaio do MTT, 30,39  $\mu\text{M}$  para o teste de CAN e 92,94  $\mu\text{M}$  no método de CVN.

A citotoxicidade da riparina II sobre a linhagem J774, determinada nos métodos de MTT e CAN, em períodos de 24 e 48 horas, é apresentada na figura 16. No tempo de incubação de 24 horas, as  $CI_{50}$  da alcamida obtidas nos experimentos de MTT e CAN foram 32,06  $\mu\text{M}$  e 48,29  $\mu\text{M}$ , respectivamente. No período de 48 horas de exposição, os valores de  $CI_{50}$  corresponderam a 28,47  $\mu\text{M}$  para o teste do MTT e 40,76  $\mu\text{M}$  no ensaio do CAN.



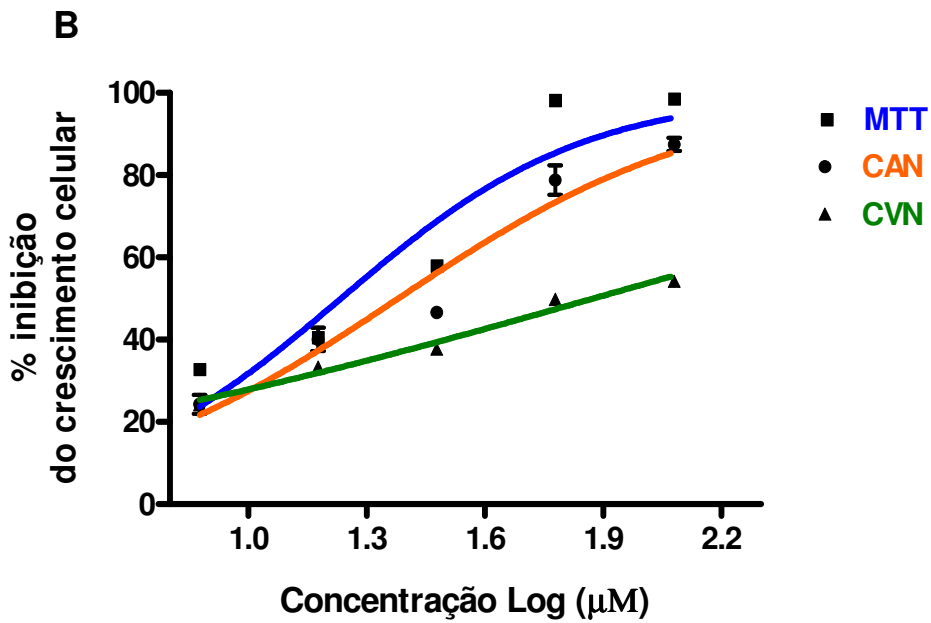
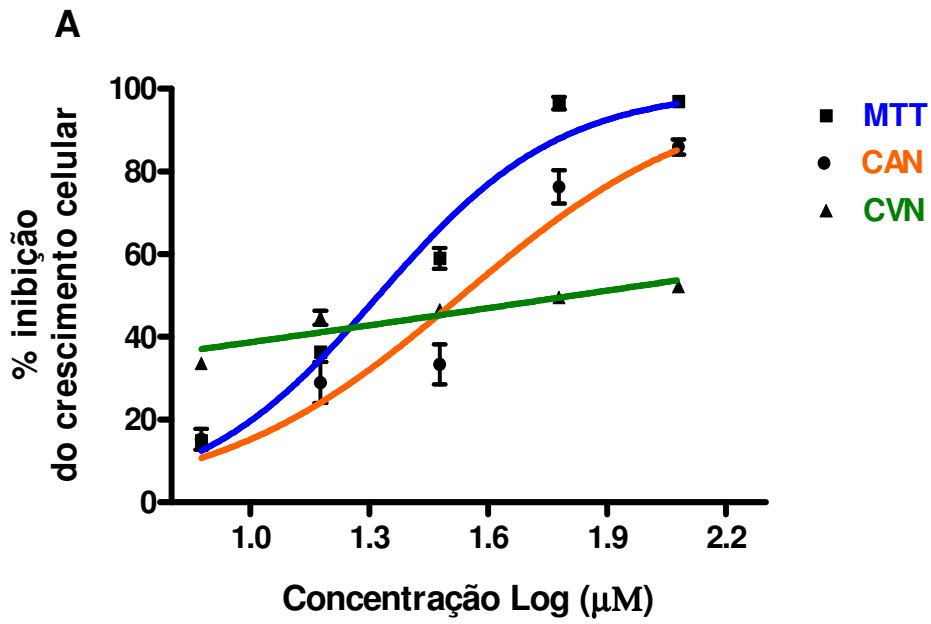
**Figura 15:** Citotoxicidade da riparina II sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicata. As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.



**Figura 16:** Citotoxicidade da riparina II sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicata. As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

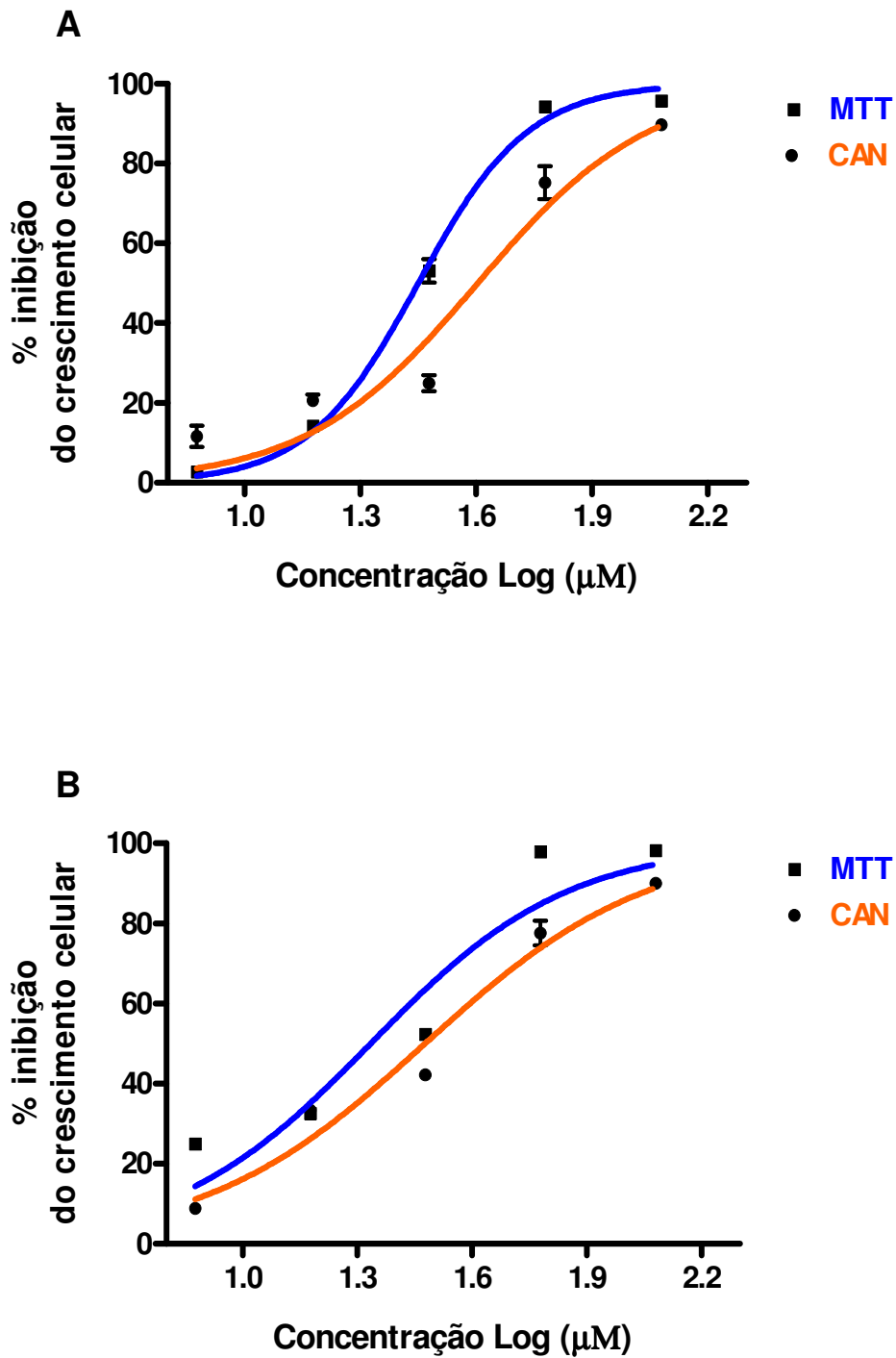
A figura 17 mostra a citotoxicidade da riparina III sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, em períodos de 24 e 48 horas. No tempo de incubação de 24 horas, as  $CI_{50}$  da alcanida obtidas nos experimentos de MTT, CAN e CVN foram: 21,02  $\mu$ M, 34,10  $\mu$ M e 65,16  $\mu$ M, respectivamente. No período de 48 horas de exposição, os valores de  $CI_{50}$  corresponderam a 17,15  $\mu$ M no ensaio de MTT, 23,96  $\mu$ M no método de CAN e 74,87  $\mu$ M para o ensaio de CVN.

O efeito citotóxico da riparina III sobre a linhagem J774, determinado nos métodos de MTT e CAN, em períodos de 24 e 48 horas, é apresentado na figura 18. No tempo de incubação de 24 horas, as  $CI_{50}$  da alcanida obtidas nos experimentos de MTT e CAN foram, respectivamente, 28,14  $\mu$ M e 40,13  $\mu$ M. No período de 48 horas de exposição, os valores de  $CI_{50}$  corresponderam a 21,58  $\mu$ M para o método do MTT e 29,94  $\mu$ M para o ensaio de CAN.



**Figura 17:** Citotoxicidade da riparina III sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicata. As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.





**Figura 18:** Citotoxicidade da riparina III sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24h (A) e 48h (B) de incubação. Os dados correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos realizados em quadruplicata. As curvas dose-resposta foram obtidas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade basal das riparinas I, II e III estão reunidos nas tabelas 5 e 6. Foi verificado, para ambas as linhagens celulares, que o tempo de exposição de 24 horas foi suficiente para causar os efeitos de maneira concentração-dependente nos experimentos de MTT e CAN, não existindo diferenças estatisticamente significantes entre as  $CI_{50}$  nos períodos de 24 e 48 horas de incubação, quando aplicado o teste *t* de Student não-pareado.

No ensaio de CVN, o efeito sobre a proliferação celular não ocorreu de maneira concentração-dependente, pois não existiram diferenças estatisticamente significativas entre o efeito produzido na menor e na maior concentração das riparinas. No entanto, como foi possível calcular os valores de  $CI_{50}$  no programa estatístico, os ajustes relativos a este ensaio são mostrados, para a linhagem L929, nas figuras 13, 15 e 17. Pode-se observar que tais ajustes são retas, o que caracteriza uma não-dependência de concentração no método de CVN. Para a linhagem J774 não foi possível calcular os valores de  $CI_{50}$  obtidos no teste de CVN.

Nas duas linhagens utilizadas nos experimentos, um maior efeito citotóxico das riparinas foi detectado no ensaio do MTT, seguindo-se o ensaio do CAN, como pode ser visto nas tabelas 5 e 6. O método de CVN foi o menos sensível a ação das substâncias (tabela 5).

Em todos os testes, a riparina III foi a mais citotóxica, seguida pela riparina II e riparina I. As linhagens celulares apresentaram uma sensibilidade semelhante aos efeitos das alcamidas, sendo que nos fibroblastos L929 os valores de  $CI_{50}$  foram menores (tabelas 5 e 6).

Com base nesses resultados, foram escolhidas as condições em que se observou um maior efeito citotóxico para detectar se as riparinas estariam promovendo a indução de eventos apoptóticos e/ou necróticos. Como não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores de  $CI_{50}$  nos períodos de 24 e 48 horas de incubação e como estes foram menores na linhagem L929, selecionaram-se então as  $CI_{50}$  estimadas no ensaio do MTT, no período de 24 horas, em fibroblastos L929.

**Tabela 5:** Citotoxicidade das alcamidas sobre a linhagem L929, avaliada pelos métodos de MTT, CAN e CVN, nos períodos de 24 e 48 horas de incubação. Os resultados correspondem aos valores de IC<sub>50</sub> e o intervalo de confiança de 95% de três experimentos realizados em quadruplicata, obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

\* p<0,001 se a sensibilidade entre os métodos foi considerada estatisticamente significativa; # p<0,001 se a potência entre as alcamidas foi considerada estatisticamente significativa.

ALCAMIDAS	MTT		CAN		CVN	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Riparina I	33,34 *#	30,56 *#	73,86 *#	62,18 *#	83,96 *#	101,84 *#
	28,7 - 38,8	27,7 - 33,7	61,2 - 89,1	44,9 - 85,9	62,5 - 112,7	74,4 - 130
Riparina II	26,37 *#	24,45 *#	43,00 *#	30,39 *#	65,51 *#	92,94 *#
	24,0 - 28,9	22,0 - 27,3	35,4 - 52,2	29,0 - 45,7	54,5 - 78,7	70,7 - 112
Riparina III	21,02 *#	17,15 *#	34,10 *#	23,96 *#	65,16 *	74,87 *#
	18,8 - 23,5	13,8 - 21,3	27,6 - 42,0	20,2 - 28,4	45,5 - 93,3	64,3 - 87,1

**Tabela 6:** Citotoxicidade das alcamidas sobre a linhagem J774, avaliada pelos métodos de MTT e CAN, nos períodos de 24 e 48 horas de incubação. Os resultados correspondem aos valores de IC<sub>50</sub> e o intervalo de confiança de 95% de três experimentos realizados em quadruplicata, obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

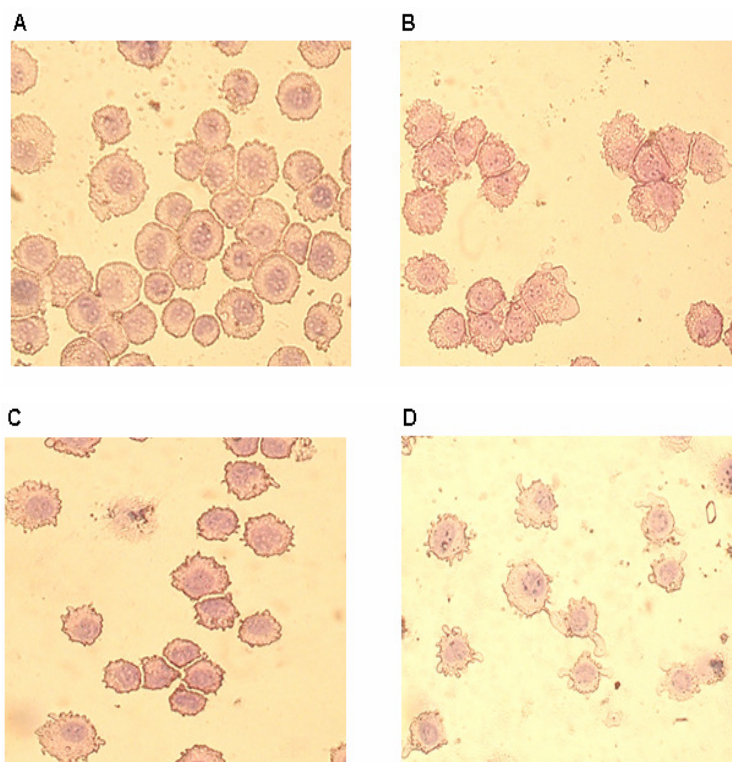
\* p<0,001 se a sensibilidade entre os métodos foi considerada estatisticamente significativa; # p<0,001 se a potência entre as alcamidas foi considerada estatisticamente significativa.

ALCAMIDAS	MTT		CAN	
	24h	48h	24h	48h
Riparina I	39,42 *#	35,97 *#	77,24 *#	69,97 *#
	34,1 - 45,5	32,2 - 40,2	55,4 - 107	56,7 - 86,4
Riparina II	32,06 *#	28,47 *#	48,29 *#	40,76 *#
	27,3 - 37,6	26,0 - 31,2	39,2 - 59,5	32,4 - 51,3
Riparina III	28,14 *#	21,58 *#	40,13 *#	29,94 *#
	26,8 - 29,5	17,7 - 26,3	34,0 - 47,3	26,4 - 33,9

## 4.2 Análise morfológica: coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina

A figura 19 mostra a análise morfológica das células L929 não tratadas (controle) e tratadas com as riparinas I (33,34  $\mu\text{M}$ ), II (26,37  $\mu\text{M}$ ) e III (21,02  $\mu\text{M}$ ). As concentrações utilizadas corresponderam aos valores de  $\text{CI}_{50}$  estimados no ensaio do MTT, no período de incubação de 24 horas.

As alcמידas causaram um aumento na irregularidade da membrana plasmática, sendo este efeito mais intensamente observado nas células expostas à riparina III, seguida pela riparina II e riparina I. Não houve alterações no citoplasma e no núcleo das células tratadas em relação ao controle que sugerisse morte celular por apoptose ou necrose. Raramente observou-se nas lâminas alguma célula apoptótica ou necrótica (dado não mostrado).

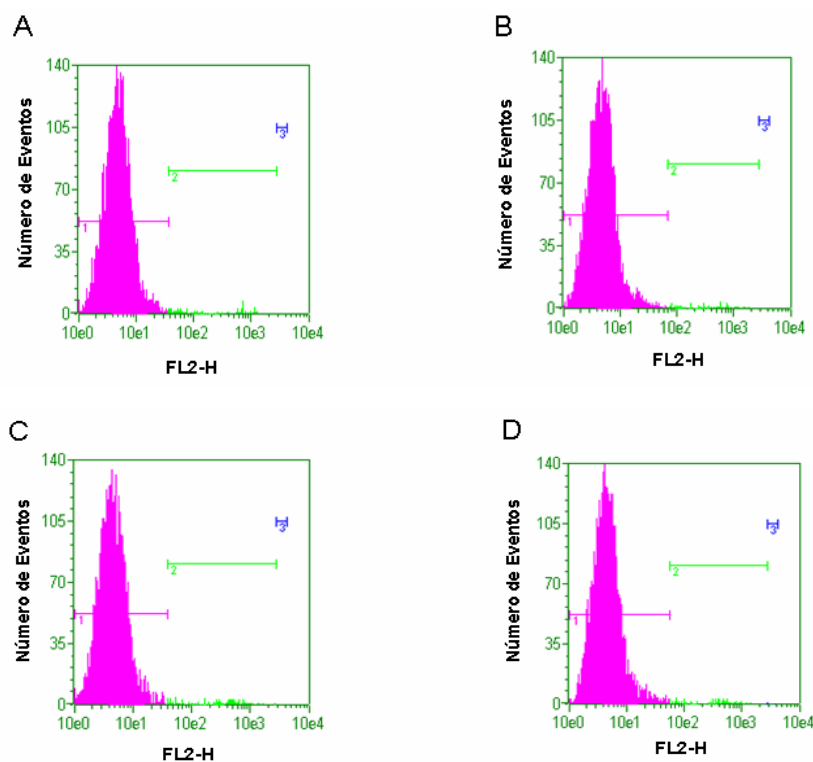


**Figura 19:** Fotomicrografia das células L929 coradas com Hematoxilina/Eosina em microscópio ótico (400x). A: controle; B: células tratadas com riparina I; C: células tratadas com riparina II; D: células tratadas com riparina III.

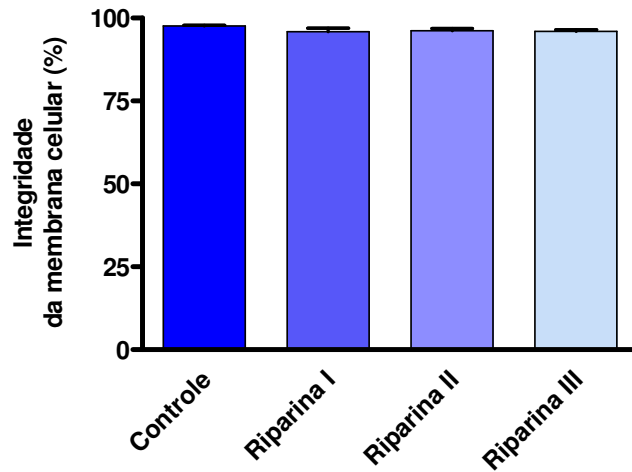
### 4.3 Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo – Viabilidade celular

Os efeitos das riparinas I (33,34  $\mu\text{M}$ ), II (26,37  $\mu\text{M}$ ) e III (21,02  $\mu\text{M}$ ) sobre a integridade da membrana celular dos fibroblastos L929 são apresentados na figura 20. As concentrações utilizadas corresponderam aos valores de  $\text{CI}_{50}$  estimados no ensaio do MTT, no período de 24 horas de exposição.

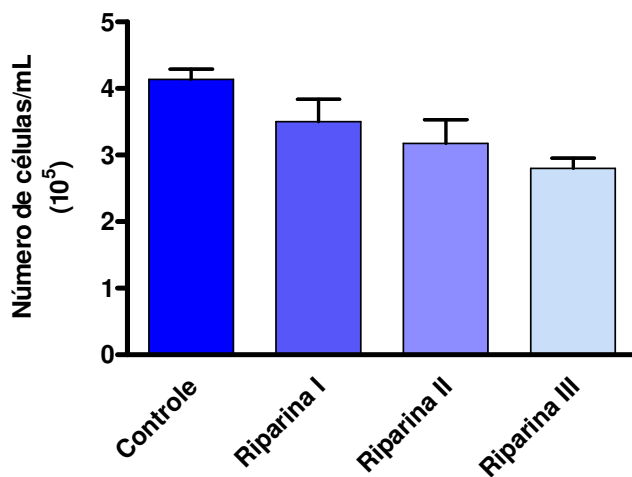
Não houve alterações significativas na integridade da membrana celular (figura 21). Ocorreu uma pequena diminuição no número de células (figura 22), mas que não se mostrou estatisticamente significativa.



**Figura 20:** Histogramas da determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. A fluorescência foi medida pelo canal RED Fluorescence FL2 (585/42 nm) que captura a fluorescência laranja-avermelhada do iodeto de propídeo. A: controle; B: células tratadas com riparina I; C: células tratadas com riparina II; D: células tratadas com riparina III; Marcador 1: % de células viáveis, com membrana celular íntegra; Marcador 2: % de células mortas, com perda da integridade da membrana celular.



**Figura 21:** Determinação da integridade da membrana celular por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA seguida por Student Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

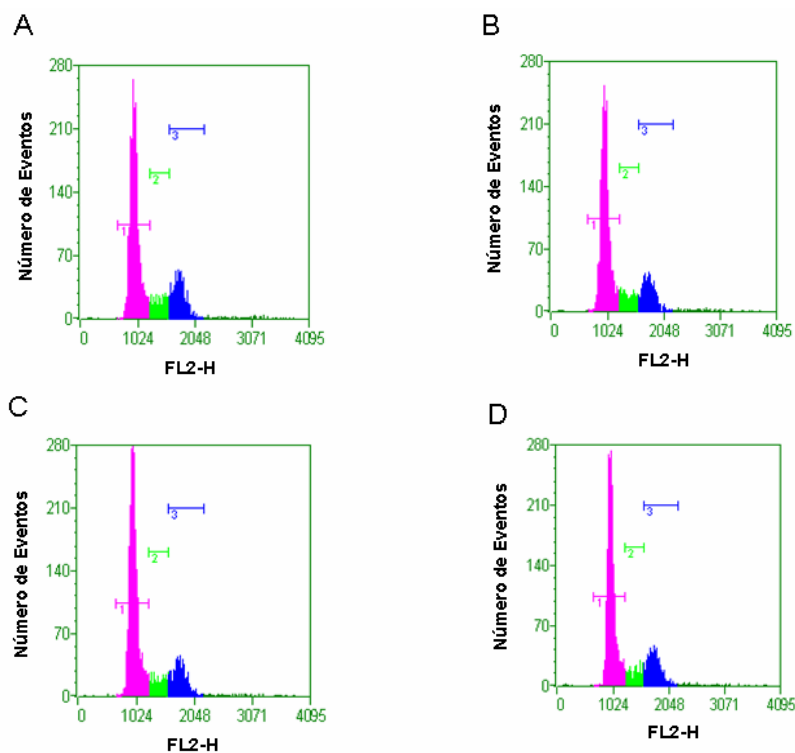


**Figura 22:** Determinação do número de células por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA seguida por Student Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.

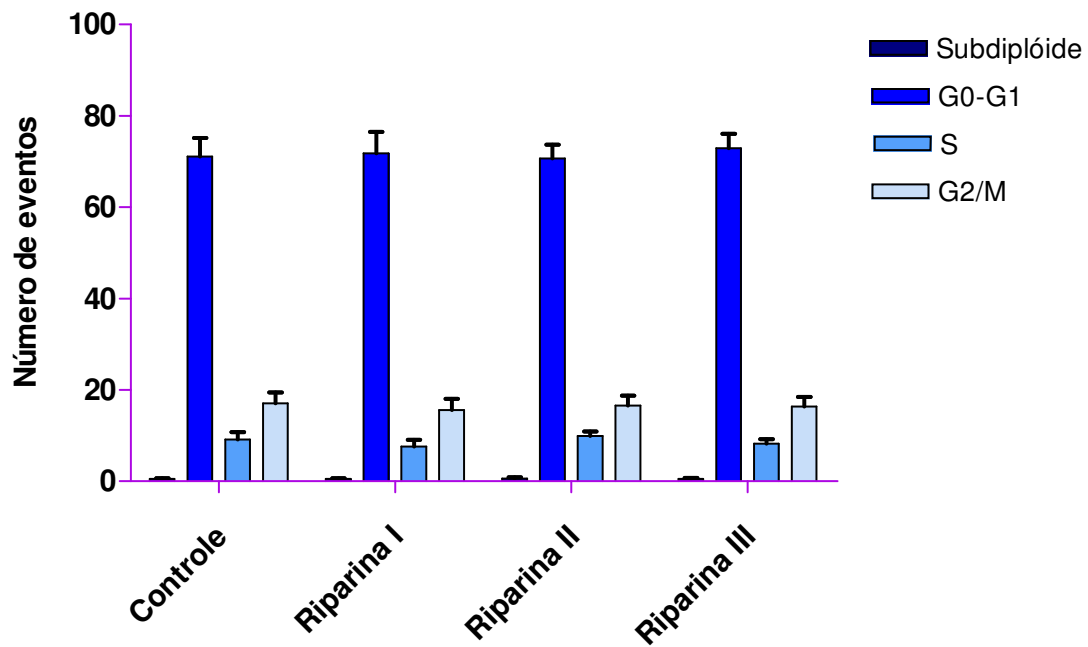
#### 4.4 Análise do ciclo celular e determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo

As figuras 23 e 24 mostram os efeitos das riparinas I (33,34  $\mu\text{M}$ ), II (26,40  $\mu\text{M}$ ) e III (21,82  $\mu\text{M}$ ) sobre o conteúdo de DNA da linhagem L929. As concentrações utilizadas corresponderam aos valores de  $\text{CI}_{50}$  estimados no ensaio do MTT, no período de incubação de 24 horas.

As alcanidas não causaram fragmentação no DNA e nem promoveram parada em nenhuma das fases do ciclo celular.



**Figura 23:** Histogramas da análise do ciclo celular e determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. A fluorescência foi medida pelo canal RED Fluorescence FL2 (585/42 nm) que captura a fluorescência laranja-avermelhada do iodeto de propídeo. A: controle; B: células tratadas com riparina I; C: células tratadas com riparina II; D: células tratadas com riparina III; Marcador 1: % de células na fase  $G_0/G_1$ ; Marcador 2: % de células na fase S; Marcador 3: % de células na fase  $G_2/M$ .



**Figura 24:** Análise do ciclo celular e determinação da fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Cinco mil eventos foram avaliados em cada experimento. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média e analisados por ANOVA seguida por Student Newman-Keuls, com nível de significância de 5%.



# Discussão

## 5 DISCUSSÃO

No processo do desenvolvimento de fármacos, é desejado se achar não apenas a substância mais ativa, mas também a menos tóxica. É importante que uma seleção seja feita no começo desse processo, ainda no estágio dos estudos *in vitro* (POPIOLKIEWICZ et al., 2005).

Os estudos *in vitro* têm sido direcionados para reduzir o uso dos animais de laboratório (GARLE et al., 1994), refinar os modelos toxicológicos *in vivo* (SNODIN, 2002; SPIELMANN et al., 1999) e ajudar na elucidação dos mecanismos de ação da substância em nível celular e molecular (EISENBRAND et al., 2002). Nessas circunstâncias, os ensaios de citotoxicidade são bastante úteis, devido a sua simplicidade, rapidez, reprodutibilidade, baixo custo e por requererem reduzida quantidade de substância, a qual pode ser testada em uma ampla gama de concentrações (PAILLARD et al., 1999; HANLEY et al., 1999).

Existe uma correlação entre os dados de citotoxicidade basal e a toxicidade aguda *in vivo* (BOTHAM, 2002). Espera-se que, se algum composto químico produza ações deletérias *in vitro* sobre diferentes linhagens celulares, algum efeito deva ser previsível quando este for utilizado em animais e humanos (CLEMEDSON et al., 2000).

Células de mamíferos são uma importante ferramenta para a avaliação da atividade citotóxica de compostos com atividade terapêutica (HALLE & SPIELMANN, 1992; PAILLARD et al., 1999). As culturas podem ser utilizadas para o “screening” da toxicidade por meio da estimativa das funções celulares basais ou por testes em funções celulares especializadas (EKWALL et al., 1990).

É necessária a execução de vários testes que foquem diferentes parâmetros para que se obtenha uma boa estimativa do potencial tóxico de uma determinada substância (DUFRANE et al., 2001; GARLE et al., 1994). Os parâmetros mais frequentemente utilizados nos ensaios de citotoxicidade são: inibição da proliferação celular, redução da função metabólica e danos à membrana celular e as organelas. A alteração de algum deles é um indicativo

de toxicidade e provê informações sobre a suscetibilidade de organelas e compartimentos celulares (JONES et al., 1999; MELO, P. S. et al., 2006).

Estudos farmacológicos demonstraram que as riparinas I, II e III apresentam várias atividades biológicas, como por exemplo: relaxante muscular (CASTELO-BRANCO et al., 2000), hipotensora (SEIXAS, 1996), antidepressiva (SOUZA, F. C. F. et al., 2004), ansiolítica (MELO, C. T. V. et al., 2006), anticonvulsivante (MONTEIRO et al., 2005), antiinflamatória (ARAÚJO et al., 2006), analsérgica (ARAÚJO et al., 2006) e antimicrobiana (CATÃO et al., 2005). Dado à ausência na literatura de estudos sobre a citotoxicidade dessas alcanidas, procurou-se avaliá-la em linhagens celulares.

O potencial citotóxico das riparinas I, II e III foi verificado em linhagens de fibroblastos L929 e macrófagos J774, as quais são comumente utilizadas em estudos de citotoxicidade (CHEN et al., 2004; SOUZA, A. O. et al., 2004). Os métodos de MTT, CAN e CVN foram executados por serem confiáveis para a avaliação da proliferação celular (MELO, P. S. et al., 2003). Esses ensaios foram aplicados a uma larga gama de concentrações das alcanidas, como usualmente é feito em compostos cuja toxicidade é desconhecida (MELO, P. S. et al., 2004). Devido o tempo de exposição necessitar durar, pelo menos, um ciclo celular completo (RIDDELL et al., 1988), os experimentos foram realizados em períodos de 24 e 48 horas de incubação das células com as substâncias.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade basal, realizados com as riparinas I, II e III, em ambas a linhagens celulares utilizadas, demonstraram que o tempo de exposição de 24 horas foi suficiente para causar os efeitos de maneira concentração-dependente nos experimentos de MTT e CAN (tabelas 5 e 6). No experimento de CVN, a resposta não ocorreu de maneira dependente de concentração.

Para todos os métodos executados, as linhagens L929 e J774 tiveram uma sensibilidade semelhante aos efeitos das alcanidas sobre a proliferação celular. Como a citotoxicidade basal reflete os efeitos adversos em estruturas e processo celulares que são intrínsecos a todas as células, a maioria dos sistemas celulares pode responder de maneira semelhante quando a toxicidade é mensurada por vários critérios de viabilidade (CASTAÑO & GÓMEZ-LECHON, 2005).

O MTT é captado por um processo de endocitose, sendo convertido por células metabolicamente ativas em um composto formazam azul insolúvel, através da redução do anel heterocíclico do tetrazólio. A quantidade de formazam, então, é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983). A alteração na taxa de redução do MTT, como a encontrada neste estudo (figuras 13 a 18), pode ser provocada por pequenas modificações na respiração celular e no metabolismo energético da célula, o que não significa um reflexo de morte celular (ANDREWS et al., 1997).

O CAN é um método útil para quantificar as mudanças na densidade celular, visto que explora a absorvância no ultravioleta dos ácidos nucléicos (BIANCHI & FORTUNATI, 1990). A variação do número celular é um indicativo de toxicidade que, geralmente, é determinado pela quantidade de componentes macromoleculares (DNA, RNA e proteínas). Quanto mais células cessam o ciclo celular, maior o decréscimo do conteúdo de DNA, o que é refletido na densidade ótica total da cultura a 260 nm (FORTUNATI & BIANCHI, 1991). Esse evento pode ser visualizado, neste trabalho, nas tabelas 5 e 6.

Nas duas linhagens utilizadas nos experimentos, um maior efeito citotóxico das riparinas I, II e III foi detectado nos ensaios do MTT e do CAN (figuras 13 a 18). No método de CVN houve uma menor sensibilidade a ação das substâncias (tabela 5). Esses dados sugerem que as alcanidas estão alterando o metabolismo da célula e os níveis dos componentes macromoleculares sem causar o rompimento das membranas plasmáticas ou lisossomais.

No caso de algumas substâncias, a inibição da respiração celular ocorre antes do desarranjo da membrana plasmática (FORTAKIS & TIMBRELL, 2006). As alterações no metabolismo energético da célula modificam as taxas de síntese de ácidos nucléicos e proteínas, levando a uma diminuição do crescimento celular (VALENTIN et al., 2001). Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados nos ensaios de MTT, CAN e CVN (tabelas 5 e 6).

As riparinas I, II e III são fármacos fracamente básicos. O acúmulo de substâncias fracamente básicas dentro do ambiente ácido do lisossomo pode causar um aumento na pressão osmótica desta organela, seguindo-se à entrada de água e subsequente inchaço. Ocorre, então, fusão com outros

pequenos lisossomos para formação de vacúolos de grande tamanho. O alargamento dos lisossomos resulta num aumento da captação do vermelho neutro pelas células (OLIVIER et al., 1995), o que pode explicar a menor sensibilidade encontrada no ensaio de CVN (tabela 5).

O grupo dihidroxibenzoil presente na riparina III forma pontes de hidrogênio intramoleculares entre o hidrogênio do grupo hidroxila e o oxigênio do grupo carbonila, indicando que as duas hidroxilas substituintes tornam o grupo dihidroxibenzoil mais planar em relação ao grupo carbonila do que o grupo hidroxibenzoil da riparina II e do que o grupo benzoil da riparina I. Adicionalmente, há uma maior transferência de carga eletrônica envolvendo os grupos carbonila e amina com o grupamento dihidroxibenzeno da riparina III. Esses fenômenos são os responsáveis pelas diferenças entre as potências das atividades farmacológicas das riparinas, sendo a III mais potente em suas atividades farmacológicas do que a II e a I (MARQUES, A. D. S. et al., 2005). Em todos os testes de citotoxicidade basal, a riparina III foi a mais citotóxica, seguida pela riparina II e riparina I (tabelas 5 e 6). Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância dos grupamentos hidroxilas para a ordem dos efeitos biológicos observados entre as alcanidas estudadas.

Para detectar se as riparinas estariam promovendo a indução de eventos apoptóticos e/ou necróticos, observaram-se as alterações morfológicas por meio da coloração diferencial por Hematoxilina/Eosina (H/E), avaliou-se a integridade da membrana celular e executou-se a análise da fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Para a realização desses experimentos, foram escolhidas as condições em que se observou um maior efeito citotóxico.

A coloração por H/E é útil para sugerir um mecanismo de ação da substância, visto que é possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como observar as alterações no citoplasma. Neste estudo, as alcanidas causaram um aumento na irregularidade da membrana plasmática, sendo este efeito mais intensamente observado nas células expostas à riparina III, seguida pela riparina II e riparina I. Conforme pode ser visto na figura 19, parece não ter havido alterações no citoplasma e no núcleo das células tratadas em relação ao controle que indicassem apoptose ou necrose.

A citometria de fluxo é uma tecnologia de fácil aplicação e alto processamento, o que a torna bastante satisfatória para o “screening” dos

efeitos tóxicos de drogas (TUSCHL & SCHWAB, 2004). Vários parâmetros encontrados nos eventos apoptóticos e necróticos podem ser avaliados por esta técnica.

Verificou-se, no experimento de avaliação de integridade da membrana celular por citometria de fluxo (figuras 20 e 21), que as riparinas não causaram alterações significativas na integridade da membrana plasmática, o que também foi visto no ensaio de CVN, indicando que não houve um aumento no número de células inviáveis.

Na análise do ciclo celular e da fragmentação do DNA, também por citometria de fluxo (figuras 23 e 24), as alcanidas não promoveram fragmentação no DNA e não causaram parada em nenhuma das fases do ciclo celular.

A estrutura química das riparinas permite um acúmulo de carga eletrônica em suas moléculas, sendo este fenômeno mais intenso na riparina III, seguida pela riparina II e riparina I (MARQUES, A. D. S. et al., 2005). Estruturas que permitam um acúmulo de carga de elétrons podem levar à formação de radicais livres reativos. Estes lesam as estruturas da cadeia de produção de ATP na mitocôndria e afetam a síntese de proteínas e de ácidos nucleicos (BARREIROS et al., 2006). Tais efeitos podem ser correlacionados com aqueles encontrados no ensaio do MTT, que é uma medida da atividade metabólica da célula, e no experimento do CAN, que é uma medida do crescimento celular como reflexo do conteúdo de ácidos nucleicos totais e da síntese de proteínas (tabelas 5 e 6).

Essas três alcanidas são capazes de induzir, de forma não específica e reversível, o relaxamento das contrações produzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia e por ocitonina e bradicinina em útero de rata virgem, com valores de  $CI_{50}$  variando de 1,7 - 5,0  $\mu\text{g/mL}$  (CASTELO-BRANCO et al., 2000). Em átrio isolado, a riparina III, na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M, causou uma inibição da frequência atrial e da força de contração (SEIXAS, 1996). Dessa forma, pode-se afirmar que as riparinas I, II e III são pouco citotóxicas, pois, nas concentrações testadas, as quais são maiores do que aquelas necessárias para a produção de seus efeitos farmacológicos nos sistemas muscular e cardiovascular, não causaram morte celular por apoptose nem por necrose.

# Conclusões

## 6 CONCLUSÕES

- Um maior efeito citotóxico das riparinas foi detectado nos ensaios do MTT e do CAN. O método de CVN foi o menos sensível a ação das alcanidas;
- O período de exposição de 24 horas foi suficiente para causar os efeitos de maneira concentração-dependente nos ensaios do MTT e do CAN. No experimento de CVN, a resposta não ocorreu de maneira dependente de concentração;
- As linhagens L929 e J774 tiveram uma sensibilidade semelhante aos efeitos das alcanidas sobre a proliferação celular;
- A riparina III foi a mais citotóxica, seguida pela riparina II e riparina I;
- Não foram observadas alterações no citoplasma nem no núcleo das células tratadas com as riparinas que sugerissem morte celular por apoptose ou necrose;
- As alcanidas não causaram perda da integridade da membrana celular, não induziram fragmentação do DNA e nem promoveram parada no ciclo celular;
- Verificamos que as riparinas I, II e III estão diminuindo o metabolismo e a taxa de crescimento celular;
- Concluimos que as riparinas I, II e III têm uma baixa toxicidade *in vitro*.



# Referências

## 7 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. B. A.; MELO, P. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; CARLI, L.; NUNES, D. S.; HAUN, M.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, p. 205 - 212, 2003.

ANDREWS, M. J.; GARLE, M. J.; CLOTHIER, R. H. Reduction of new tetrazolium alamar blue <sup>TM</sup>, in cultured rat hepatocytes and liver fraction. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 25, p. 641 - 653, 1997.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; SALES, T. P.; LEITE, C. P.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. Estudo da atividade anti-inflamatória de N-benzoiltiramina (riparina I) de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos. In: **XXI Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2006, Águas de Lindóia.

ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; LEITE, C. P.; MELO, R. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G.; SOUSA, F. C. F. Estudo dos efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de riparina I de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos. In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2006, Salvador.

BARBOSA, R. C. S. B.; GIESBRECHT, A. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 1/2, p. 91 - 94, 1988.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615 - 2617, 1987.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of severall new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 332 - 334, 1990.

BARILE, F. A.; DIERICKX, P. J.; KRISTEN, U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 155 -162, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113 - 123, 2006.

BERRIDGE, M. V.; TAN, S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, p. 474 - 482, 1993.

BIANCHI, V.; FORTUNATI, E. Cellular effects of an anionic surfactant detected in V79 fibroblasts by different cytotoxicity tests. **Toxicology in Vitro**, v. 4, n. 1, p. 9 - 16, 1990.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n.1, p. 1 - 6, 1988.

BOTHAM, P. A. Acute Systemic Toxicity. **Institute for Laboratory Animal Resources Journal**, v. 43, p. 27 - 30, 2002.

BROADHEAD, C. L.; COMBES, R. D. The current status for food additives toxicity testing and the potential for application of the Three Rs. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 29, p. 471 - 485, 2001.

CARERE, A.; STAMMATI, A.; ZUCCO, F. In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 153 - 160, 2002.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHON, M. J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 695 - 705, 2005.

CASTELO-BRANCO, V. U. **Preparação e estudos farmacológicos do éter metílico de N-benzoiltiramina e do éter metílico de N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina. 1992.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary pharmacological studies

on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 19, n. 3, p. 197 - 202, 2000.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O. L.; PEREIRA, M. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Evaluation of the antimicrobial activity about multiresistents samples of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, n. 4, p. 247 - 249, 2005.

CHEN, J.; JIANG, J.; ZHANG, F.; YU, H.; ZHANG, J. Cytotoxic effects of environmentally relevant chlorophenols on L929 cells and their mechanisms. **Cell Biology and Toxicology**, v. 20, p. 183 - 196, 2004.

CHU, I. Alternative methods to animal testing: a Canadian health protection branch perspective. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 23, p. 257 - 261, 1995.

CINGI, M. R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E.; REGGIANI, D.; BIANCHI, V.; TIOZZO, R.; ZUCCO, F. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicology in Vitro**, v. 5, p. 119 - 125; 1991.

CLEMEDSON, C.; BARILE, F. A.; CHESNE, C.; COTTIN, M.; CURREN, R.; EKWALL, B. A.; FERRO, M.; GOMEZ-LECHON, M. J.; IMAI, K.; JANUS, J.; KEMP, R. B.; KERSZMAN, G.; KJELLSTRAND, P.; LAUVRIJSEM, K.; LOGEMANN, P.; MCFARLANE-ABDULLE, E.; ROGUET, R.; SEGNER, H.; SEIBERT, H.; THUVANDER, A.; WALUM, E.; EKWALL, B. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further in vitro assays. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 28, p. 159 - 200, 2000.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CORRÊA, D. H. A.; MELO, P. S.; CARVALHO, C. A. A.; AZEVEDO, M. B. M.; DURÁN, N.; HAUN, M. Dehydrocrotonin and its h-cyclodextrin complex: cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 510, p. 17 - 24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52 - 60, 1997.

DE CONTI, R.; DE OLIVEIRA, D. A.; FERNANDES, A. M. P.; MELO, P. S.; RODRIGUEZ, J. A.; HAUN, M.; DE CASTRO, S. L.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; DURÁN, N. Application of a multiendpoint cytotoxicity assay to the trypanocidal compounds 2-propen-1-amine derivatives and determination of their acute toxicity. **In Vitro and Molecular Toxicology**, v. 11, p. 153 - 160, 1998.

DUFRANE, D.; CORNU, O.; VERRAES, T.; SCHECROUN, N.; BANSE, X.; SCHNEIDER, Y. J.; DELLOYE, C. In vitro evaluation of acute cytotoxicity of human chemically treated allografts. **European Cells and Materials**, v. 1, p. 52 - 58, 2001.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDS, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; LEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193 - 236, 2002.

EKWALL, B.; SILANO, V.; PAGANUZZI-STAMMATI, A.; ZUCCO, F. Toxicity tests whit mammalian cell cultures. Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects. **Scientific Committee on Problem of the Environment**, p. 75 - 97, 1990.

FEHER, M.; SCHMIDT, J. M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. **Journal of Chemical Information and Computer Science**, v. 43, p. 218 - 227, 2003.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99 - 105, 1998.

FORMIGLI, L.; PAPUCCI, L.; TANI, A.; SCHIAVONE, N.; TEMPESTINI, A.; ORLANDINI, G. E.; CAPACCIOLI, S.; ORLANDINI, S. Z. Apopnecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, p. 41 - 49, 2000.

FORTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, p. 171 - 177, 2006.

FORTUNATI, E.; BIANCHI, V. Spectrophotometric determination of total macromolecules for the evaluation of cellular density in cytotoxicity tests. **Alternatives to Laboratory Animals**, n. 19, 1991.

FREIMOSER, F. M.; JAKOB, C. A.; AEBI, M.; TUOR, U. R. S. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3727 - 3729, 1999.

GARLE, M. J.; FENTEM, J. H.; FRY, J. R. In vitro cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicology in vitro**, v. 8, p. 1303 - 1312, 1994.

HALLE, W.; SPIELMANN, H. Two procedures for the prediction of acute toxicity (LD50) from cytotoxicity data. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 40 - 49, 1992.

HANLEY, A. B.; McBRIDE, J.; OEHLISCHLAGER, S.; OPARA, E. Use of a flow cell bioreactor as a chronic toxicity model system. **Toxicology in Vitro**, v. 13, p. 847 - 851, 1999.

HARPER, J. V.; BROOKS, G. The mammalian cell cycle: an overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 296, p. 113 - 153, 2005.

HU, D.; GU, W.; KAMOTANI, Y.; GROTBORG, J. B.; TAKAYAMA, S. Microfluidics for flow cytometric analysis of cells and particles. **Physiological Measurement**, v. 26, n. 3, p. 73 - 98, 2005.

JONES, P. A.; BRACHER, M.; MARENUS, K.; KOJIMA, H. Performance of the neutral red uptake assay in the COLIPA international validation study on alternatives to the rabbit eye irritation test. **Toxicology in Vitro**, v. 13, p. 325 - 333, 1999.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 619 - 642, 1998.

LEITE, C. P.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; FONSECA, F. N.; PEREIRA, F. A.; VASCONCELOS, S. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; SOUSA, F. C. F. Efeitos de N-(2-hidroxibenzoil)-tiramina (riparina II) de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) nos modelos comportamentais de convulsão induzida por pentilenotetrazol e estricnina em camundongos. In: **XXI Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2006, Águas de Lindóia.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, n. 2, p. 581 - 593, 1997.

MARQUES, A. D. S.; ZHENG, C.; LIN, C. T.; TAKAHATA, Y.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C. Electronic and structural effects in muscular relaxants: riparin I and riparin III. **Journal of Molecular Structure**, v. 753, p. 13 - 21, 2005.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família lauraceae lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p.195 - 206, 2001.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99, p. 157 - 168, 1998.

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; SILVA, M. I. G.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F. Estudo da atividade ansiolítica de riparina I, riparina II e riparina III de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos. In: **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2005, Águas de Lindóia.

MELO, C. T. V.; LEITE, C. P.; MONTEIRO, A. P.; SILVA, M. I. G.; ARAÚJO, F. L. O.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F. Estudo da atividade antidepressiva de riparina I, riparina II e riparina III de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) em camundongos. In: **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2005, Águas de Lindóia.

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, V. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FRANCA-FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA F. C. F. Anxiolytic-Like Effects of (*O*-Methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 3, p. 451 - 454, 2006.

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benzimidazole on V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 116, p. 237 - 242, 2000.

MELO, P. S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135 - 141, 2001.

MELO, P. S.; CAVALCANTE, H. M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 143 - 151, 2003.

MELO, P. S.; AZEVEDO, M. B. M.; ZULLO, M. A. T.; FABRIN-NETO, J. B.; HAUN, M. Cytotoxicity of the phytosterol diosgenin and its derivatives in rat cultured hepatocytes and V79 fibroblasts. **Human & Experimental Toxicology**, p. 1 - 7, 2004.

MELO, P. S.; FABRIN-NETO, J. B.; MORAES, S. G.; ASSALIN, M. R.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative toxicity of effluents processed by different treatments in V79 fibroblasts and the Algae *Selenastrum capricornutum*. **Chemosphere**, v. 62, p. 1207 - 1213, 2006.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Drug design based on natural products. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105 - 111, 2001.

MONTEIRO; A. P.; MELO; C. T. V.; LEITE; C. P.; FILHO; F. E. R.; GUTIERREZ; S.; BARBOSA-FILHO, J. M; SOUSA, F. C. F. Anticonvulsant properties of riparin I (rip I) and riparin III (rip III) from *Aniba Riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, supl. 1, p. 241, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65 p. 55 - 63, 1983.

NICOLLETTI, I.; MAGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 217- 279, 1997

OLIVIER, P.; TESTARD, P.; MARZINT, D.; ABBOTT, D. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicology in Vitro**, v 9, n. 2, p. 133 - 138, 1995.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, p. 271 - 280, 2004



PAILLARD, F.; FINOT, F.; MOUCH, I.; PRENEZ, A.; VERICAT, J. A. Use of primary cultures of rat hepatocytes to predict toxicity in the early development of new chemical entities. **Toxicology in Vitro**, v. 13, p. 693 - 700, 1999.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células?** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237 - 243, 2001.

POPIOLKIEWICZ, J.; POLKOWSKI, K.; SKIERSKI, J. S.; MAZUREK, A. P. In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs – genistein glycosides. **Cancer Letters**, v. 229, p. 67 - 75, 2005.

POZZOLINI, M.; SCARFI, S.; BENATTI, U.; GIOVINE, M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. **Analytical Biochemistry**, v. 313, p. 338 - 341, 2003.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. Lauraceae Jussieu na Reserva ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo. **Rodriguésia**, v. 53, n. 82, p. 59 - 121, 2002.

RENZI, D.; VALTONILA, M.; FOSTER, R. The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, p. 89 - 96; 1993.

RIDDELL, R. J.; PANACER, D. S.; WILDE, S. M.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. The importance of exposure period and cell type in in vitro cytotoxicity tests. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 14, p. 86 - 92, 1988.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364 - 369, 2001.

SCHATTENBERG, J. M.; GALLE, P. R.; SCHUCHMANN, M. Apoptosis in liver disease. **Liver International**. v. 26, p. 904 - 911, 2006.

SEIXAS, S. R. S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiopressora.** 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGÍ, M.; PEÑA, J.; RÁMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLÉS, M. T. In vitro biocompatibility assessment of poly (ε-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, p. 5603 - 5611, 2004.

SILVEIRA, A. L. **Toxicidade pré-clínica dos análogos das riparinas I, III e III utilizando modelos *in vitro***. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SNODIN, D. J. An EU perspective on the use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology. **Toxicology Letters**, v. 127, p. 161 - 168, 2002.

SOUZA, A. O.; SANTOS-JR, R. R.; SATO, D. N.; AZEVEDO, M. M. M.; FERREIRA, D. A.; MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, C. L.; DURÁN, N. Free 2-propen-1-amine derivative and inclusion complexes with β-cyclodextrin: scanning electron microscopy, dissolution, cytotoxicity and antimycobacterial activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 682 - 689, 2004.

SOUZA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V. T. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. F.; VIANA, G. S. B. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 78, n. 1, p. 27 - 33, 2004.

SOUZA, F. C. F.; MONTEIRO, A. P.; MELO, C. T.; OLIVEIRA, G. R.; VASCONCELOS, S. M.; FRANCA-FONTELES, M. M.; GUITIERREZ, S. J.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 12, p. 1005 - 1008, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SPIELMANN, H.; GENSCHOW, E.; LIEBSCH, M.; HALLE, W. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing of up and down procedure (UDP) from cytotoxicity data. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 27, p. 957 - 966, 1999.

STARK, D. M.; SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E.; BABICH, H. Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 449 - 455, 1986.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D. J.; HANKARD, P. K.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 20 - 29, 2004.

THOMAS, G.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (O-Methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leukocytes. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 103 - 107, 1994.

THORNTON, D. E.; JONES, K. H.; JIANG, Z.; ZHANG, H.; LIU, G.; CORNWELL, D. G. Antioxidant and cytotoxic tocopheryl quinones in normal and cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 6, p. 963 - 976, 1995.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. E. Flow cytometric methods used as screening tests for basal toxicity of chemicals. **Toxicology in Vitro**, v.18, p. 483 - 491, 2004.

VALENTIN, I.; PHILIPPE, M.; LHUGUENOT, J. C.; CHAGNON, M. C. Uridine uptake inhibition as a cytotoxicity test for a human hepatoma cell line (HepG2 cells): comparison with the neutral red assay. **Toxicology**, v. 158, p. 127 - 139, 2001.

VARANDA, E. A.; VARELLA, S. D.; RAMPAZO, R. A.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: A naphthopyranone dimmer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 664 - 668, 2006.

VERAS, M. L.; BEZERRA, M. Z.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LUTUFO, L. V. Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **Planta Medica**, v. 70, p. 551 - 555, 2004.

VIAN, L.; VINCENT, J.; MAURIN, J.; FABRE, I.; GIROUX J.; CANO, J. P. Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. **Toxicology in Vitro**, v. 9, n. 2, p. 185 - 190, 1995.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Science**, v. 19, p. 124 - 128, 2004.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v. 18, p. 153 - 163, 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)